

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΚΑΛΑΦΑΘΗ ΕΛΕΝΗ

**ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΤΟΥ ΤΟΠΟΥ
SERENDIPITY-ALPHA ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΕΤΑΙ ΣΤΗΝ ΕΜΒΡΥΙΚΗ
ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ**

ΛΑΡΙΣΑ 2015

UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY & BIOTECHNOLOGY



KALAFATI ELENI

**ISOLATION OF THE GENOMIC AREA OF *SERENDIPITY*-ALPHA LOCUS
INVOLVED IN THE DEVELOPMENT OF THE OLIVE FRUIT FLY**

LARISA 2015

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας & Γονιδιωματικής του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, το χρονικό διάστημα Φεβρουαρίου 2014 - Ιουνίου 2015 υπό την επίβλεψη του καθηγητή Μοριακής Βιολογίας κ. Κ. Μαθιόπουλου.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος: Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας

Σαραφίδου Θεολογία: Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών
Πληθυσμών

Τσουμάνη Κωνσταντίνα: Δρ Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημιακή
Υπότροφος ανάθεσης διδακτικού έργου

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η στιγμή της παράδοσης της διπλωματικής εργασίας πλησιάζει και το ταξίδι της φοιτητικής μου ζωής φτάνει σιγά σιγά στον προορισμό του. Σε αυτό το σημείο, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στους ανθρώπους που συνέβαλαν στην υλοποίηση της.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Ματθιοπουλο που με δέχτηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας & Γονιδιωματικής και μου έδωσε την ευκαιρία να περάσω από τη θεωρία των βιβλίων στην πράξη των πειραμάτων, να βιώσω την εργαστηριακή ρουτίνα και να αντιληφθώ την ηθική που πρέπει να έχει ένας βιοεπιστήμονας. Ακόμα, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για τις ευχάριστες ώρες που πέρασα στα αμφιθέατρα παρακολουθώντας τις διαλέξεις του και θέλω να τονίσω ότι αποτελεί μέντορα για κάθε νέο που αγαπά το αντικείμενο της μοριακής βιολογίας.

Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω την διδάσκουσα Κωνσταντίνα Τσουμάνη για την καθοδήγηση, τις συμβουλές που μου έδωσε και την ανεξάντλητη υπομονή της. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επίκουρο καθηγήτρια κ. Θεολογία Σαραφίδου για τη συμμετοχή της στη τριμελή επιτροπή καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία και τις ξέγνοιαστες στιγμές που περάσαμε το προηγούμενο καλοκαίρι στη μαγευτική Λάρισα! Ένα ευχαριστώ είναι λίγο για τις υποψήφιες διδάκτορες του εργαστηρίου Γρηγορίου Μαρία- Ελένη και Κοσκινιώτη Παναγιώτα για την πολύτιμη βοήθεια τους.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τους φίλους μου για την υποστήριξη τους αλλά κυρίως γιατί όταν με είδαν να "πέφτω" δεν πίστεψαν ποτέ ότι δεν θα "σηκωθώ". Είναι σημαντικό να υπάρχουν άνθρωποι να σου θυμίζουν τον στόχο σου όταν η απογοήτευση επισκιάζει τα όνειρά σου. Θα ήταν παράλειψη να μην αναφερθώ στους συμφοιτητές μου Σωτηρία και Αλέξανδρο που από το πρώτο κιόλας έτος γίναμε αχώριστοι φίλοι και ανεχτήκαν την τρέλα και τη γκρίνια μου! Ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα παιδιά της παρέας που μοιραστήκαμε τον ενθουσιασμό μας, τους προβληματισμούς μας, τις χαρές και τις λύπες και γέμισαν τη φοιτητική μου ζωή με αξέχαστες εμπειρίες!

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*, είναι ένα ολομετάβολο έντομο, το οποίο παρασιτεί στον καρπό της ελιάς και αποτελεί τον σημαντικότερο εχθρό της ελαιοπαραγωγής. Η μελέτη του εντόμου σε μοριακό και γενετικό επίπεδο δεν είναι μόνο σημαντική για τη βασική έρευνα για το συγκεκριμένο είδος, αλλά και για την ανεύρεση νέων βιολογικών μεθόδων καταπολέμησης για τον έλεγχο των πληθυσμών του. Μέθοδοι που έχουν εφαρμοστεί με επιτυχία σε συγγενικά του δάκου είδη εντόμων είναι η SIT (Sterile Insect Technique) και η RIDL (Release of Insects Carrying the Dominant Lethal). Ωστόσο, προσπάθειες εφαρμογής τους για την καταπολέμηση του δάκου συναντούν εμπόδια και είναι αναποτελεσματικές γι' αυτό και το ενδιαφέρον στρέφεται πλέον στην ανάπτυξη συστημάτων θηλεο-ειδικής εμβρυικής θνησιμότητας (Female-Specific Embryonic Lethality, FSEL). Για την ανάπτυξη ενός τέτοιου συστήματος στο δάκο είναι απαραίτητη η μελέτη και ανάλυση γονιδίων, τα οποία εμπλέκονται στην εμβρυογένεση.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, στόχος ήταν η μελέτη του γονιδίου *serendipity -alpha* (*sry-a*), το οποίο εκφράζεται κατά τη διάρκεια της εμβρυικής ανάπτυξης του εντόμου και συγκεκριμένα στο στάδιο της κυτταροποίησης. Με τη βοήθεια ομόλογων εκκινητών που σχεδιάστηκαν βάσει δεδομένων RNA-seq έγινε ενίσχυση με PCR τμήματος του γονιδίου. Πραγματοποιήθηκε απομόνωση και ταυτοποίηση τμήματος του γονιδίου *sry-a* στο δάκο και έγινε προσπάθεια διαλογής γονιδιωματικής βιβλιοθήκης του εντόμου ώστε να απομονωθεί η πλήρης αλληλουχία του. Παράλληλα, ολοκληρώθηκε η αλληλούχηση του γονιδιώματος του δάκου και ήταν διαθέσιμη η γονιδιωματική αλληλουχία του γονιδίου επιτρέποντας την *in silico* ανάλυσή του. Αρχικά, προσδιορίστηκε η οργάνωση του γονιδίου και συγκεκριμένα το μέγεθος της αλληλουχίας του που είναι 3005 bp και περιέχει 8 εξόνια, 7 ιντρόνια, τις 5' και 3' UTR μεγέθους 252 bp και 23 bp αντίστοιχα. Το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης έχει μέγεθος 1983 bp. Επιπλέον, έγινε σύγκριση της αλληλουχίας με ομόλογες αλληλουχίες συγγενικών ειδών διερευνώντας τις ομοιότητες αλλά και τις διαφορές σε νουκλεοτιδικό και αμινοξικό επίπεδο. Τέλος, προσδιορίστηκε βάσει χαρακτηριστικών αλληλουχιών-μοτίβων η δυνητική αλληλουχία του υποκινητή του γονιδίου, η οποία βρίσκεται περίπου 500 bp ανοδικά της 5' UTR.

ABSTRACT

The olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, is an holometabolous insect, which pests on the olive fruits and constitutes the most important enemy of the olive cultivations. The study of the insect in molecular and genetic level is not only important for the basic research for this species, but also for the improvement of biological control methods in order to reduce insect's population. Effective applications of such methods are the Sterile Insect Technique (SIT) and the Release of Insects Carrying the Dominant Lethal (RIDL), which have been successfully tested in other relative species. Considerable efforts had been made to use these methods to reduce the populations of the olive fruit fly, but encountered significant obstacles and were ineffective, so the interest turns on systems, such as Female-Specific Embryonic Lethality System (FSEL). The successful development of FSEL system in the olive fruit fly requires the study and analysis of genes involved in insect's embryogenesis.

The purpose of this approach was to study and analyze the *serendipity-alpha* gene (*sry-α*), which is expressed only in embryonic stages of the insect and specifically in the stage of cellularization. A fragment of the gene *sry-α* was amplified using homologous primers that were designed based on RNA-seq data. Part of the olive fruit fly's *sry-α* gene was identified and used to screen the genomic library in an attempt to isolate gene's full-length sequence. Simultaneously, the whole genome sequencing was completed and the sequence of the *B. oleae sry-α* gene was available. This sequence was further analysed *in silico* in order to define gene structure and was also compared with homologous sequences from relative species in both nucleotide and protein level. The length of *sry-α* genomic region was determined as 3005 bp. The 5' and 3' UTRs were 252 bp and 23 bp respectively. Additionally, 8 exons and 7 introns were defined and the length of the ORF was 1983 bp. Finally, the putative promoter's sequence was characterized 500 bp upstream the 5'UTR, based on general promoter motifs.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	9
Abstract.....	10
1. Εισαγωγή.....	15
1.1 Συστηματική Κατάταξη.....	17
1.2 Μορφολογία του εντόμου.....	18
1.3 Βιολογικός κύκλος.....	19
1.4 Οικονομική σημασία του εντόμου.....	19
1.5 Μέθοδοι καταπολέμησης.....	20
1.5.1 Χημική μέθοδος.....	20
1.5.2 Μαζική παγίδευση.....	21
1.5.3 Χρήση παρασιτοειδών.....	21
1.5.4 Χρήση μικροοργανισμών.....	22
1.5.5 Μέθοδος παρεμπόδισης συζεύξεων.....	22
1.5.6 Τεχνική στειρών εντόμων (Sterile Insect Technique, SIT).....	22
1.6 Μειονεκτήματα προαναφερθέντων μεθόδων καταπολέμησης του δάκου.....	24
1.7 Μέθοδος απελευθέρωσης εντόμων που φέρουν επικρατές θνησιγόνο γονίδιο- RIDL.....	24
1.8 Το σύστημα θηλεο-ειδικής εμβρυικής θνησιμότητας FSEL ως εναλλακτική μέθοδος καταπολέμησης εντόμων.....	25
1.9 Η εμβρυογένεση στη <i>Drosophila</i>	27
1.10 Το στάδιο της κυτταροποίησης.....	29
1.11 Η διαδικασία της εμβρυογένεσης στα υπόλοιπα είδη εντόμων.....	31
1.12 Γονίδια που εμπλέκονται στην κυτταροποίηση.....	32
1.13 Ο ρόλος του γονιδίου <i>serendipity-alpha</i> στη διαδικασία της κυτταροποίησης.....	35
1.14 Σκοπός.....	37

2. Μέθοδοι & Υλικά.....	39
2.1 Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων.....	41
2.1.1 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από έντομα <i>B. oleae</i> (DNA extration).....	41
2.1.2 Απομόνωση φαγικού DNA από το βακτηριοφάγο λ (phage preps).....	41
2.2 Χειρισμός νουκλεϊκών οξέων.....	42
2.2.1 Εκχύλιση DNA με φαινόλη/χλωροφόρμιο.....	42
2.2.2 Κατακρήμνιση νουκλεϊκών οξέων.....	43
2.2.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	43
2.2.4 Ανάκτηση από πήκτωμα αγαρόζης (gel extraction).....	45
2.2.5 Πέψη με ένζυμα περιορισμού.....	46
2.2.6 Επεξεργασία με RNAase A.....	46
2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	47
2.4 Υβριδοποίηση.....	48
2.4.1 Σήμανση ανιχνευτών (Labeling probe).....	48
2.4.2 Μεταφορά DNA σε νάυλον μεμβράνη.....	49
2.4.3 Μεταφορά φαγικών πλακών σε νάυλον μεμβράνη.....	50
2.4.4 Υβριδοποίηση του ανιχνευτή σε μεμβράνη.....	51
2.4.5 Εμφάνιση σήματος.....	51
2.5 Κλωνοποίηση.....	52
2.5.1 Αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA σε πλασμιδιακό φορέα (ligation).....	52
2.5.2 Παρασκευή δεκτικών κυττάρων για ηλεκτροδιάτρηση.....	53
2.5.3 Μετασχηματισμός κυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση.....	54
2.5.4 Καλλιέργεια μετασχηματισμένων κυττάρων και διάκριση ανασυνδυασμένων κλώνων.....	54
2.6 Βακτηριοφάγος λ- DASH® II- Γονιδιωματική βιβλιοθήκη.....	55
2.6.1 Προετοιμασία βακτηρίων- ξενιστών του βακτηριοφάγου lambda.....	56

2.6.2	Επίστρωση γονιδιωματικής βιβλιοθήκης σε τρυβλίο.....	56
2.6.3	Συλλογή πλάκας βακτηριοφάγου λ.....	57
2.6.4	Διαλογή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης.....	57
2.7	<i>In silico</i> ανάλυση νουκλεοτιδικών και πρωτεϊνικών αλληλουχιών.....	57
2.7.1	Αναζήτηση πληροφορίας σε βιολογικές βάσεις δεδομένων (ΒΔ).....	57
2.7.2	Αναζήτηση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών.....	58
2.7.3	Αναζήτηση πρωτεϊνικών αλληλουχιών	59
2.7.4	Εξειδικευμένη αναζήτηση στη Flybase.....	59
2.7.5	BLAST (Basic Logical Alignment Search Tool).....	59
2.7.6	Clustal.....	61
2.7.7	Αναζήτηση ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης.....	61
2.7.8	Omiga.....	61
3.	Αποτελέσματα.....	63
3.1	Εντοπισμός και ενίσχυση μεταγραφόμενων αλληλουχιών με ομόλογους	65
3.2	Διαλογή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης του δάκου.....	67
3.3	Ταυτοποίηση της αλληλουχίας με κλωνοποίηση και αλληλούχηση.....	69
3.4	<i>In silico</i> ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδίου <i>sry-a</i>	70
3.5	Σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το γονίδιο <i>sry-a</i>	72
3.6	<i>In silico</i> ανάλυση για τον εντοπισμό της αλληλουχίας του υποκινητή.....	75
4.	Συζήτηση.....	79
4.1	Μοριακή ανάλυση.....	80
4.2	<i>In silico</i> ανάλυση	81
4.3	Συμπεράσματα.....	82
	Βιβλιογραφία.....	83
	Παράρτημα Ι.....	89
	Παράρτημα ΙΙ.....	90

ΕΙΣΑΓΟΓΗ



Ο δάκος της ελιάς (επιστημονική ονομασία: *Bactrocera oleae*) είναι το σοβαρότερο πρόβλημα που αντιμετωπίζει η ελαιοπαραγωγή όχι μόνο στην Ελλάδα αλλά και σε όλες τις χώρες τις Μεσογείου και γενικότερα όπου καλλιεργείται η ελιά. Συνεπώς, υπάρχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως προς τη μελέτη της μορφολογίας, φυσιολογίας και συμπεριφοράς των φυσικών του πληθυσμών.



Εικόνα 1.1: Ενήλικο άτομο *B. oleae* (φωτογραφία από Curtis Takahashi)

1.1 Συστηματική Κατάταξη

Ο δάκος της ελιάς είναι ένα ολομετάβολο έντομο που ανήκει στην οικογένεια Tephritidae, η οποία περιλαμβάνει περισσότερα από 4.000 και περισσότερα από 350 είναι έντομα μεγάλης οικονομικής σημασίας, τα οποία παρασιτούν σε γεωργικές καλλιέργειες και ανήκουν κυρίως στα γένη *Anastrepha*, *Bactrocera*, *Ceratitis*, *Dacus*, *Rhagoletis* (Van Houdt et al., 2010).

Η συστηματική κατάταξη του *B. oleae*:

ΦΥΛΟ	Arthropoda
ΚΛΑΣΗ	Insecta
ΥΠΟΚΛΑΣΗ	Neoptera
ΔΙΑΙΡΕΣΗ	Holometabola
ΤΑΞΗ	Diptera
ΥΠΕΡΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ	Tephritoidea
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ	Tephritidae
ΥΠΟΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ	Dacinae
ΦΥΛΗ	Dacini
ΓΕΝΟΣ	Bactrocera
ΥΠΟΓΕΝΟΣ	Daculus
ΕΙΔΟΣ	Oleae



1.2 Μορφολογία του εντόμου

Το αυγό είναι λευκού χρώματος, επιμήκες, κυλινδρικό, με λεία επιφάνεια, έχει μήκος 0,8 mm και διάμετρο 0,2 mm. Στη μικροπύλη είναι λοβοειδές σε σχέση με την οπίσθια πλευρά (Εικόνα 1.2).

Η προνύμφη έχει ανοικτό κίτρινο χρώμα και στο τέλος της ανάπτυξής της έχει μήκος 7-8 mm. Το πρόσθιο μέρος του σώματος είναι στενότερο από το οπίσθιο. Το κεφάλι της είναι τραπεζοειδές και στο πρόσθιο άκρο της φέρει δύο τριμερείς κεραίες. Η προνύμφη δεν φέρει κεφαλική κάψα, χαρακτηριστικό της οικογένειας Tephritidae (Εικόνα 1.3).

Η νύμφη είναι ανοιχτού καστανού χρώματος, ελλειψοειδούς σχήματος και έχει μήκος 4 mm. Βρίσκεται εντός του νυμφικού περιβλήματος (puparium), το οποίο σχηματίζεται από το προνυμφικό έκδυμα (Εικόνα 1.4).

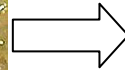
Το ενήλικο άτομο είναι μια μύγα, της οποίας το μήκος κυμαίνεται από 4 έως 5 mm και το άνοιγμα των πτερυγίων της είναι περίπου 12 mm. Το κεφάλι είναι κοκκινωπό, σφαιρικό και πλατύτερο του θώρακα. Έχει οφθαλμούς σύνθετους με μεταλλικές ανταύγκες πράσινου-πορφυρού χρωματισμού. Ο θώρακας έχει επίσης κοκκινωπό χρώμα, με τρεις επιμήκεις σκοτεινότερες ραβδώσεις. Η κοιλία είναι καστανού-κίτρινου χρωματισμού και στα θηλυκά καταλήγει σε έναν ωοθήτη μαύρου χρωματισμού (Εικόνα 1.5). Τα φτερά είναι διαφανή και έχουν μια μαύρη κηλίδα στο άκρο τους (Τζανακάκης, 1980).



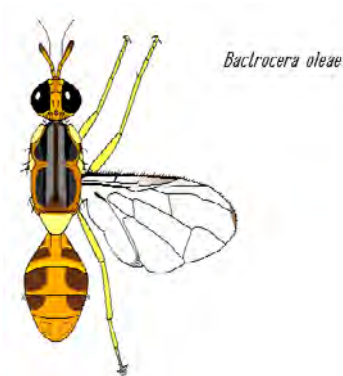
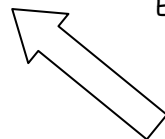
Εικόνα 1.2: Αυγό



Εικόνα 1.3: Προνύμφη



Εικόνα 1.4: Νύμφη



Bactrocera oleae



Εικόνα 1.5Α: Ακμαίο θηλυκό



Β: Ακμαίο αρσενικό

1.3 Βιολογικός κύκλος

Ο βιολογικός κύκλος του εντόμου ποικίλει ανάλογα με τις καιρικές συνθήκες. Τα πρώτα ακμαία άτομα εμφανίζονται την περίοδο Απριλίου-Μαΐου. Ανάλογα με την περιοχή, κάθε χρόνο εμφανίζονται δύο ως πέντε γενιές (Karatos and Fletcher, 1984). Κατά τη διάρκεια του χειμώνα, το έντομο βρίσκεται σε νυμφικό στάδιο κάτω από το έδαφος. Σε συνθήκες καλοκαιριού, σε χρονικό διάστημα 6 με 10 ημερών, στο θηλυκό ωριμάζουν η ωοθήκη και το πρώτο σέτ αυγών. Τα θηλυκά εναποθέτουν τα αυγά τους σε πρόωρα ώριμους καρπούς ελιάς. Περίπου 10 με 12 αυγά εναποθέτονται καθημερινά (Katsoyannos, 1992), συνήθως 1 σε κάθε καρπό και περίπου 200 με 250 κατά τη διάρκεια ζωής τους.

Ο βιολογικός κύκλος του δάκου είναι στενά συνδεδεμένος με τις περιβαλλοντικές συνθήκες, κυρίως τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος και τη θέση των ελαιόδεντρων. Γενικά, οι βέλτιστες συνθήκες για εναπόθεση αυγών και ανάπτυξη των προνυμφών είναι η θερμοκρασία να κυμαίνεται στους 20 με 30°C, και η ύπαρξη ενός υγρού κλίματος (Crovetti et al., 1982; Fletcher and Karatos, 1983; Tsitsipis, 1980).

Στάδιο	Περίοδος	Φθινόπωρο- Χειμώνας
Αυγό	2-4 μέρες	10 μέρες (φθινόπωρο)
Προνύμφη	10-13 μέρες	20 μέρες ή περισσότερο
Νύμφη	10 μέρες	Μέχρι τους 4 μήνες (νύμφες που διαχειμάζουν)
Ενήλικο	Αρκετούς μήνες	

Πίνακας 1.1: Κύκλος ζωής του δάκου *B. oleae*.

1.4 Οικονομική σημασία του εντόμου

Ο δάκος της ελιάς θεωρείται ένα έντομο μεγάλης οικονομικής σημασίας. Κάθε χρόνο, προξενεί μεγάλες οικονομικές ζημιές, οι οποίες σε περιόδους έξαρσης, μπορούν να ξεπεράσουν το 50% της συνολικής παραγωγής στις περιοχές της Μεσογείου όπου υπάρχει αυξημένη καλλιέργεια ελαιόδεντρων (Mazomenos et al., 2002). Ωστόσο, το ποσοστό της ζημιάς περιορίζεται στο 5% με τη χρήση μεθόδων αντιμετώπισης (Nardi et al., 2005).

Η ζημιά που προκαλείται έγκειται στο γεγονός ότι ο δάκος κατατρώει το μεσοκάρπιο της ελιάς το οποίο αλλοιώνεται και πέφτει. Οι περιοχές του καρπού, στις οποίες έχουν δημιουργήσει στοές οι προνύμφες εμφανίζονται εξωτερικά σαν σκούρες κηλίδες (Εικόνα 1.6). Η σπή ωτοκίας του δάκου βοηθά την εγκατάσταση μυκήτων που προξενούν δευτερογενείς προσβολές (Πελεκάσης, 1980). Εκτός από την ποσοτική επέρχεται και ποιοτική ζημιά με την υποβάθμιση της ποιότητας του λαδιού, το οποίο είναι υψηλής περιεκτικότητας σε οξέα και καθίστανται ακατάλληλο για βρώση. Ακόμα, αλλοιώνονται τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος εξαιτίας της παρουσίας προνυμφών μέσα στους καρπούς

του (Ζιώγας, 1996). Ο δάκος της ελιάς ανέκαθεν αποτελούσε τη μαστίγα της ελαιοπαραγωγής και συνεχώς καταβάλλονται προσπάθειες για την ανακάλυψη νέων βελτιωμένων μεθόδων για την καταπολέμηση του.



Εικόνα 1.6: Καρποί προσβεβλημένοι από *B. oleae*

1.5 Μέθοδοι καταπολέμησης

Η καταπολέμηση του δάκου επιτυγχάνεται με τη χρήση πολλών διαφορετικών μεθόδων, φιλικών ή μη προς το περιβάλλον. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται τόσο στις καλλιέργειες ελιάς όσο και σε πειραματικό επίπεδο είναι οι εξής:

- ❖ Χημική μέθοδος-Εντομοκτόνα
- ❖ Μαζική παγίδευση
- ❖ Χρήση παρασιτοειδών
- ❖ Χρήση μικροοργανισμών
- ❖ Μέθοδος παρεμπόδισης συζεύξεως
- ❖ Χρήση φυσικών εντομοκτόνων
- ❖ Τεχνική στείρων εντόμων (SIT)

1.5.1 Χημική μέθοδος – εντομοκτόνα

Η χημική μέθοδος βασίζεται σε καθολικούς ψεκασμούς με εντομοκτόνα και εφαρμόζεται από το 1935 (με χρήση αρσενικών νατρίου). Αργότερα, το 1950 χρησιμοποιήθηκαν οργανοφωσφορικά, παραθείο, κτλ. Η χημική μέθοδος περιλαμβάνει δύο φάσεις, την προληπτική και την θεραπευτική. Η πρώτη είναι αποτελεσματική κυρίως για τα ενήλικα άτομα ενώ η δεύτερη για τις προνύμφες. Η προληπτική μέθοδος αποτελεί μέτρο του κρατικού μηχανισμού δακοκτονίας. Στηρίζεται στην εκτέλεση δολωματικών ψεκασμών εντομοκτόνων με σκοπό τη βρώση του μίγματος ψεκασμού και την θανάτωση των εντόμων πριν προλάβουν να ωοτοκήσουν (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος, 1998). Η θεραπευτική μέθοδος εφαρμόζεται από τους παραγωγούς και βασίζεται στη χρήση ψεκαστικού. Το σημαντικότερο μειονέκτημα της θεραπευτικής προσέγγισης σε σχέση με την προληπτική είναι η θανάτωση σε μεγαλύτερο βαθμό ωφέλιμων εντόμων κάτι που συχνά συνεπάγεται έξαρση πληθυσμών κοκκοειδών και άλλων εχθρών της ελιάς.



1.5.2 Μαζική παγίδευση

Η μαζική παγίδευση βασίζεται στη σύλληψη μεγάλου αριθμού ενήλικων εντόμων με σκοπό τη μείωση του πληθυσμού. Οι τύποι παγίδων που κυκλοφορούν στο εμπόριο είναι οι εξής:

- Κίτρινες κολλώδεις επιφάνειες με ελκυστικά μέσα τροφής ή φερορμόνης (Εικόνα 1.7)
- Κίτρινες τοξικές επιφάνειες με ελκυστικά μέσα και εντομοκτόνα
- Πλαστικές κολλώδεις φιάλες με περιεχόμενο τροφικού ελκυστικού
- Παγίδα Eco-Trap. Πρόκειται για μια χάρτινη πράσινου χρώματος παγίδα που επενδύεται εσωτερικά με μια πλαστική αδιάβροχη μεμβράνη (Εικόνα 1.8). Η επιφάνεια της καλύπτεται από το εντομοκτόνο Deltamethrin και ως ελκυστικό περιέχει κρυσταλλικό όξινο ανθρακικό αμμώνιο και φερορμόνη (Haniotakis et al., 1986).

Συνήθως χρειάζεται μια εντομοπαγίδα ανά δυο δένδρα. Σε μικρούς πληθυσμούς έχουν αξιόλογη αποτελεσματικότητα. Σε μεγάλους πληθυσμούς όμως είναι αναποτελεσματικές και χρειάζονται και άλλα επιπρόσθετα μέσα.



Εικόνα 1.7: Κολλώδης παγίδα



Εικόνα 1.8: Παγίδα Eco-Trap

1.5.3 Χρήση παρασιτοειδών

Τα σημαντικότερα παρασιτοειδή του δάκου της ελιάς είναι τα εκτοπαράσιτα Υμενόπτερα της οικογένειας Chalcidoidea: *Pnigalio mediterraneus*, *Eupelmus urozomus*, *Eurytoma martelli* και *Cyrtospyx latipes*. Ωστόσο, ο πληθυσμός τους μειώνεται το Φθινόπωρο, στη διάρκεια του οποίου ο πληθυσμός του δάκου αυξάνεται και είναι αναποτελεσματικά στην αντιμετώπιση του. Συνεπώς, οι προσπάθειες επικεντρώθηκαν στην αναζήτηση "εισαγόμενων" εχθρών του εντόμου. Συγκεκριμένα, μελέτες εστιάζουν σε τέσσερα ενδοπαράσιτα του δάκου, τρία του γένους *Psytalia* (*P. concolor*, *P. lounsburyi*, *P. ponerothraupis*) και ένα του γένους *Forpus* (*F. arisanus*). Η εκκόλαψη και η ανάπτυξη τους στο εσωτερικό των ωών και των προνυμφών του ξενιστή έχει ως αποτέλεσμα τον θάνατο του ξενιστή (Calvitti et al., 1999; Sime et al., 2006; Rousse et al., 2007; Karam et al., 2008; Yokoyama et al., 2008). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι διασταυρώσεις μεταξύ διαφορετικών στελεχών *P. concolor*, καθώς η κυτταροπλασματική ασυμβατότητα, που παρατηρείται, θα μπορούσε να αξιοποιηθεί για τον έλεγχο πληθυσμών εντόμων οικονομικής σημασίας (Billah et al., 2007).

1.5.4 Χρήση μικροοργανισμών

Η μόλυνση ενήλικων εντόμων *B. oleae* με απομονωμένα στελέχη *Bacillus thuringiensis* προκαλεί μείωση του ποσοστού βιωσιμότητας, ωοαπόθεσης και εκκόλαψης (Navrozidis et al., 2000). Σε πειράματα που απομονώθηκαν διάφορα στελέχη μυκήτων από έντομα της οικογένεια Tephritidae βρέθηκε ότι το στέλεχος SMU-21 του μύκητα *Mucor hiemalis* εμφάνιζε ποσοστά τοξικότητας άνω του 80% ενώ τα προϊόντα του μεταβολισμού του εμφάνιζαν ποσοστά τοξικότητας 100% (Konstantopoulou, 2006).

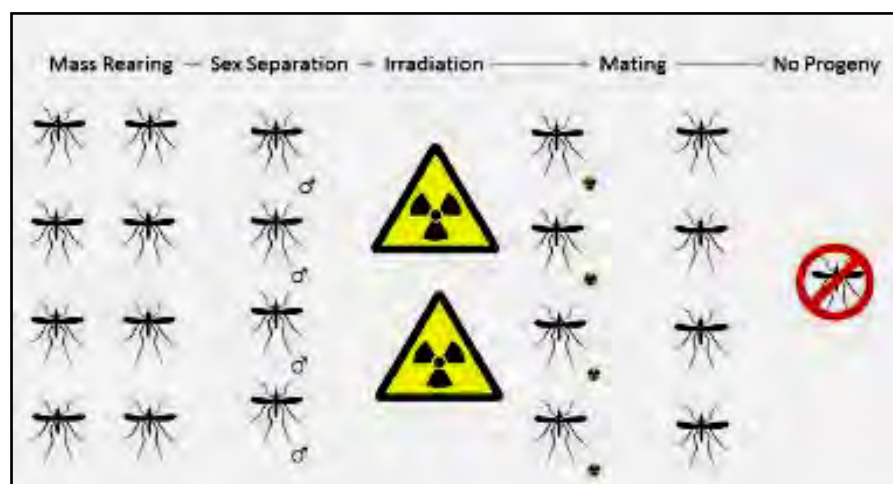
1.5.5 Μέθοδος παρεμπόδισης συζεύξεων

Στόχος της συγκεκριμένης μεθόδου είναι ο κορεσμός του περιβάλλοντος του εντόμου με "τεχνητή" φερομόνη προκειμένου τα έντομα που εκτίθενται σε αυτή, να μην μπορούν να αναγνωρίσουν την πηγή προέλευσης της φυσικής φερομόνης. Εφαρμογές της παραπάνω μεθόδου δεν έχουν δώσει μέχρι σήμερα ικανοποιητικά αποτελέσματα για τον δάκο της ελιάς (Montiel Bueno and Mata, 1983).

1.5.6 Τεχνική στείρων εντόμων (Sterile Insect Technique, SIT)

Η μέθοδος αυτή είναι αρκετά περίπλοκη και απαιτεί ένα στάδιο σοβαρής προετοιμασίας για πρακτική εφαρμογή της στη φύση. Η μέθοδος στείρων εντόμων (Sterile Insect Technique, SIT) αποτελεί την πλέον διαδεδομένη εναλλακτική μέθοδο αντιμετώπισης των εντόμων, λόγω του ότι είναι ειδο-ειδική, περιβαλλοντικά φιλική και μπορεί να εφαρμοστεί σε μεγάλη κλίμακα. Αν και ως ιδέα ξεκίνησε τις δεκαετίες του 1930 και 1940, για πρώτη φορά εφαρμόστηκε σε ευρεία κλίμακα το 1955 με σκοπό την εξάλειψη του παρασιτικού σκουληκιού *Cochliomyia hominivorax* (New world screwworm) από τις ΗΠΑ, το Μεξικό και την κεντρική Αμερική (Knipling et al, 1955). Για να γίνει η στείρωση του εντόμου πρέπει να εξασφαλισθεί η μαζική παραγωγή των εντόμων σε ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας, φωτισμού, υγρασίας και σε τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα. Η μέθοδος αυτή συνιστά την απελευθέρωση αρσενικών στείρων ατόμων (μέσω εφαρμογής ακτινοβολίας γ ή Χ) στη φύση με ελεγχόμενο τρόπο, οι οποίοι ανταγωνίζονται τα αρσενικά άτομα αγρίου τύπου κατά τη σύζευξή τους με τα θηλυκά, μειώνοντας την αναπαραγωγική ικανότητα του πληθυσμού. Η στείρωση γίνεται στο στάδιο της νύμφης (pupa). Η εξαπόλυση των νυμφών στη φύση μπορεί να γίνει από εδάφους ή από τον αέρα και οι νύμφες πρέπει να είναι μέσα σε ειδική συσκευασία έτσι ώστε να είναι δυνατή η έξοδος των ακμαίων στο φυσικό τους περιβάλλον. Όπως είναι γνωστό τα στείρα έντομα διαβιώνουν σε περιβάλλον διαφορετικό από το φυσικό, διατρέφονται με τεχνητές τροφές και μπορεί να αλλάξουν διάφορες φυσιολογικές και βιολογικές συνήθειες. Τα αρσενικά αυτά άτομα είναι ικανά προς σύζευξη και μεταφορά σπέρματος, όμως το σπέρμα αυτό καθ' αυτό αδυνατεί να δώσει γένεση σε απογόνους και αν προκύψουν κάποια άτομα θα πεθάνουν πρόωρα πριν ολοκληρωθεί η ανάπτυξη τους λόγω των προκαλούμενων από την ακτινοβολία χρωμοσωμικών δομικών αλλαγών (Robinson, 2002). Παρόλα αυτά, τα στείρα αρσενικά έντομα παρουσιάζουν μειωμένη ανταγωνιστικότητα ως προς σύζευξη σε σχέση με τα αρσενικά άγριου τύπου του φυσικού πληθυσμού.

Με σκοπό την βελτίωση της μεθόδου, αρχικά αναπτύχθηκαν μέσω κλασσικής γενετικής τεχνικές επιλεκτικής απομάκρυνσης των θηλυκών εντόμων από τον προς απελευθέρωση πληθυσμό. Οι τεχνικές αυτές αναφέρονται στη βιβλιογραφία ως GSMs (Genetic Sexing Mechanisms) και βασίζονται σε κάποια φυλετικά συνδεδεμένη διαφοροποίηση, με χρήση ενός επικρατούς δείκτη επιλογής. Ο δείκτης επιλογής μπορεί να είναι ένα γονίδιο ανθεκτικότητας, το χρώμα της νύμφης ή ένα θνησιγόνο εξαρτώμενο από τη θερμοκρασία, ενσωματωμένος στο Υ χρωμόσωμα που καθορίζει το αρσενικό φύλο (Meats et al., 2002). Η σύνδεση του χαρακτηριστικού που προσδίδει τον επιθυμητό φαινότυπο πραγματοποιείται με τη δημιουργία χρωμοσωμικών μετατοπίσεων στο Υ χρωμόσωμα, που προκαλούνται μετά από έκθεση σε ακτινοβολία. Με αυτόν τον τρόπο, τα ομόζυγα για την υπολειπόμενη αυτοσωμική μετάλλαξη θηλυκά άτομα πέθαιναν, ενώ τα αρσενικά επιβίωναν λόγω της σύνδεσης του αγρίου τύπου αλληλομόρφου του γονιδίου. Το παράδειγμα εφαρμογής του φυλετικού διαχωρισμού πραγματοποιήθηκε στη μύγα της Μεσογείου, *C. capitata*, χρησιμοποιώντας μια υπολειπόμενη αυτοσωμική μετάλλαξη, η οποία είναι θνησιγόνα σε υψηλή θερμοκρασία. Ωστόσο, η δημιουργία μεταλλάξεων μέσω χρωμοσωμικών μετατοπίσεων βρέθηκε ότι μειώνει τη βιωσιμότητα των εντόμων επηρεάζοντας τη σεξουαλική ανταγωνιστικότητα, τη φυσιολογία και τη συμπεριφορά τους (Alrhey, 2002; Alrhey, 2007). Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι τα στελέχη ήταν ασταθή και επιρρεπή σε γενετικούς ανασυνδυασμούς (Franz, 2002). Τέλος, η τεχνική αυτή βασίζονταν στην τυχαία πρόκληση μεταλλάξεων γεγονός που καθιστούσε αδύνατη τη μεταφορά των γενετικών εργαλείων από οργανισμό σε οργανισμό, εφόσον απαιτείται η εκ νέου δημιουργία των στελεχών για κάθε είδος. Αν και αυτή η μέθοδος έχει θετικά αποτελέσματα στην αντιμετώπιση του συγγενικού με το δάκο είδους *C. capitata*, τα αποτελέσματα στο δάκο ήταν αρνητικά καθώς οι πληθυσμοί των στείρων αρσενικών δάκων είχαν διαφορετική συζευκτική συμπεριφορά από τα αρσενικά των φυσικών πληθυσμών.



Εικόνα 1.9: Μαζική εκτροφή εντόμων και έκθεση αρσενικών σε ακτινοβολία με αποτέλεσμα της στέρωσής τους. Μετά από σύζευξη με θηλυκά άγριου τύπου δεν προκύπτουν βιώσιμοι απόγονοι (André Barretto, Bruno Wilke and Marrelli MT, 2012)

1.6 Μειονεκτήματα των προαναφερθέντων μεθόδων καταπολέμησης του δάκου

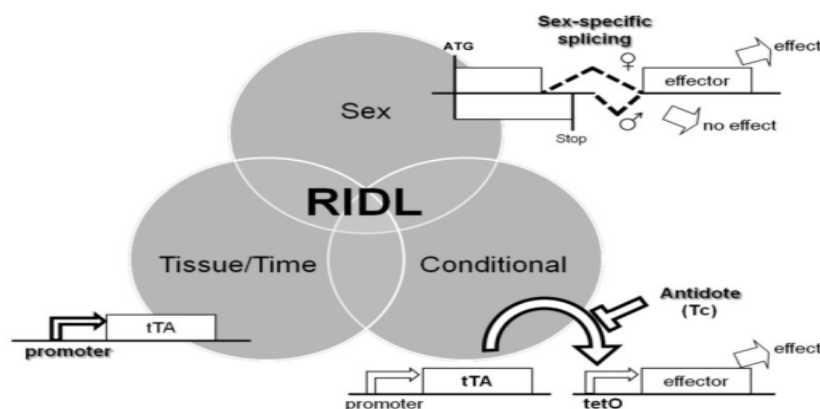
Στις μέρες μας, η καταπολέμηση του δάκου βασίζεται κυρίως στη χρήση εντομοκτόνων, ενώ συμπληρωματικά χρησιμοποιούνται και οι παγίδες. Οι δύο αυτές μέθοδοι εγκυμονούν μια σειρά κινδύνων για τη δημόσια υγεία και την ισορροπία των οικοσυστημάτων. Συνεπώς, καθίσταται απαραίτητη η ανάπτυξη νέων μεθόδων ελέγχου, εξειδικευμένων στο δάκο που ωστόσο δεν θα συνοδεύονται από αρνητικές επιπτώσεις. Από τη μία μεριά, τα συμβατικά χημικά εντομοκτόνα προκαλούν περιβαλλοντική ρύπανση και μόλυνση του παραγόμενου προϊόντος (καρποί, ελαιόλαδο) και από την άλλη, η μαζική παγίδευση εντόμων δημιουργεί μια σειρά οικολογικών ζητημάτων εξαιτίας της παγίδευσης και ωφέλιμων εντόμων.

Η μέθοδος SIT έχει δύο σημαντικά μειονεκτήματα, τα οποία δυσχεραίνουν τη χρήση της σε ευρεία κλίμακα. Ένα από τα σημαντικότερα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι τα στείρα αρσενικά έντομα που δημιουργούνται, πρέπει να ανταγωνιστούν τα άγρια αρσενικά του πληθυσμού για σύζευξη με τα θηλυκά (Atkinson and Michel, 2002). Ωστόσο προκαλείται δραματική μείωση της ανταγωνιστικότητας των στείρων εντόμων, λόγω της χρήσης ακτινοβολίας, η οποία προκαλεί χρωμοσωμικές μεταλλάξεις. Κατά συνέπεια, δεν προτιμώνται από τα θηλυκά για σύζευξη σε σχέση με τα αρσενικά άγριου τύπου. Αξίζει να αναφερθεί ότι η μείωσης της ποσότητας της ακτινοβολίας στην οποία εκτίθενται τα έντομα που εκτρέφονται έχει σαν αποτέλεσμα τη μερική στειρώσή τους, απελευθερώνοντας έτσι και γόνιμα έντομα στον πληθυσμό (Maggioli et al., 2006). Ένα ακόμα μειονέκτημα της SIT είναι η ταυτόχρονη απελευθέρωση και θηλυκών εντόμων μαζί με τα στείρα αρσενικά. Μπορεί τα θηλυκά να είναι και αυτά στείρα αλλά εξακολουθούν να έχουν την ικανότητα ωοαπόθεσης και επιλέγονται προς σύζευξη από τα στείρα αρσενικά. Επιπλέον, αυξάνουν το κόστος εκτροφής αφού παράγεται ίσος αριθμός εντόμων και των δύο φύλων. Για να ξεπεραστεί αυτό το μειονέκτημα, έρευνες εστιάζουν πλέον στην ανάπτυξη μοριακών εργαλείων που θα επιτρέπουν τον αποτελεσματικό διαχωρισμό ως προς το φύλο, ώστε τελικά να επιλέγονται προς απελευθέρωση στο πεδίο μόνο αρσενικά άτομα ή στη θανάτωση των θηλυκών ατόμων σε κάποιο αναπτυξιακό στάδιο (Alphey, 2002).

1.7 Μέθοδος απελευθέρωσης εντόμων που φέρουν επικρατές θνησιγόνο γονίδιο-RIDL

Η ανάγκη για βελτίωση των μεθόδων καταπολέμησης με έμφαση στην ειδο-ειδικότητα οδηγεί αναπόφευκτα στην ανάγκη για διεύρυνση των μοριακών δεδομένων και στην εστίαση σε συγκεκριμένα μόρια με κρίσιμο ρόλο για τις βασικές λειτουργίες του δάκου. Για την αντιμετώπιση των προβλημάτων που προκαλεί η ακτινοβολία στην ανταγωνιστική ικανότητα του εντόμου έχουν αναπτυχθεί τεχνικές που βασίζονται στην τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA, όπως η RIDL (Thomas et al, 2000). Σε αυτήν τη μέθοδο εισάγεται στα έντομα ένα επικρατές θνησιγόνο γονίδιο, το οποίο συνήθως ελέγχεται από ένα θηλεο-ειδικό υποκινητή προκειμένου να εκφραστεί μόνο σε θηλυκά άτομα και ανάλογα με τον τύπο του σε διαφορετικό στάδιο της αναπτυξιακής διαδικασίας του εντόμου. Τα έντομα στα οποία έχει εισαχθεί το διαγονίδιο, αρχικά, αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται υπό εργαστηριακές συνθήκες χάριν στο σύστημα ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης με εφαρμογή του αντιβιοτικού τετρακυκλίνη. Το σύστημα περιλαμβάνει ορισμένα ρυθμιστικά στοιχεία τα οποία

ελέγχουν την έκφραση του θνησιγόνου γονιδίου και ελέγχονται και απενεργοποιούνται από την τετρακυκλίνη. Παρουσία τετρακυκλίνης σε εργαστηριακές συνθήκες το θνησιγόνο γονίδιο δεν εκφράζεται οπότε τα έντομα επιβιώνουν κανονικά. Όταν φτάσουν σε έναν επιθυμητό αριθμό διοχετεύονται στις περιοχές καλλιέργειας, όπου απουσία της τετρακυκλίνης εκφράζουν κανονικά το θνησιγόνο γονίδιο προκαλώντας το θάνατο των θηλυκών απογόνων (Labbé GM et al., 2012). Πρόσφατα, δημιουργήθηκε η πρώτη διαγονιδιακή κατασκευή με σκοπό τη χρήση της σε σύστημα RIDL για το δάκο (Ant et al., 2012). Η κατασκευή αυτή ονομάζεται OX3097 και χρησιμοποιεί ένα τρανσποζόνιο τύπου piggyBac για την εισαγωγή της στο γονιδίωμα του εντόμου. Το συγκεκριμένο σύστημα υπερβαίνει τα προβλήματα που παρουσιάζονταν κατά τις προσπάθειες δημιουργίας στείρων δάκων με τις κλασσικές μεθόδους SIT. Τα διαγονιδιακά αρσενικά έντομα παρουσιάζουν συγχρονισμένους ρυθμούς αναπαραγωγής με τα θηλυκά αγρίου τύπου, ενώ δεν υστερούν στην ικανότητα προσέλευσης και σύζευξης με τα θηλυκά, συγκριτικά με τα αρσενικά αγρίου τύπου (Ant et al., 2012). Τα παραπάνω συμπεράσματα προκύπτουν από πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε ελεγχόμενες εργαστηριακές συνθήκες και για την επιβεβαίωση τους πρέπει να διεξαχθούν αντίστοιχες προσεγγίσεις σε συνθήκες φυσικού περιβάλλοντος.

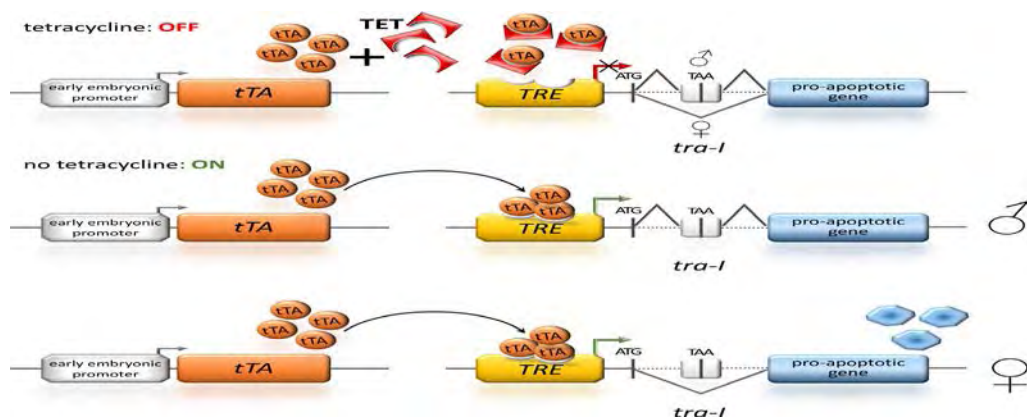


Εικόνα 1.10: Η μέθοδος RIDL ως εφαρμογή της συνθετικής βιολογίας: συνδυαστικός έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης με καθορισμένα στοιχεία ελέγχου. Στην κατασκευή RIDL, που περιγράφεται στην εικόνα, ο υποκινητής, το φυλο-ειδικό ιντρόνιο (sex-specific intron) και ο μηχανισμός trans-ενεργοποίησης από τετρακυκλίνη (καταστολέας) δρουν ως ανεξάρτητα ρυθμιστικά στοιχεία, των οποίων ο συνδυασμός οδηγεί στην παραγωγή του επιθυμητού γονιδιακού προϊόντος. Απουσία τετρακυκλίνης ο ενεργοποιητής tTA, ο οποίος βρίσκεται καθοδικά ενός υποκινητή επιλογής (π.χ. Θηλεο-ειδικός), εκφράζεται και συνδέεται σε μια συγκεκριμένη αλληλουχία του DNA (tetO). Η περιοχή tetO οδηγεί στην έκφραση ενός γονιδίου τελεστή (π.χ. γονίδιο τοξικότητας ή θνησιγόνου γονίδιο). Με αυτόν τον τρόπο, το γονίδιο αυτό εκφράζεται σύμφωνα με το πρότυπο του επιλεγμένου υποκινητή. Ωστόσο, ακόμα και σε μικρές συγκεντρώσεις τετρακυκλίνης, η πρωτεΐνη του tTA δε μπορεί να συνδεθεί στον χειριστή tetO και έτσι καταστέλλεται η έκφραση του γονιδίου τελεστή (Labbé GM et al., 2012).

1.8 Το σύστημα Θηλεο-ειδικής εμβρυικής θνησιμότητας FSEL ως εναλλακτική μέθοδος καταπολέμησης εντόμων

Η ανάγκη δημιουργίας μιας εναλλακτικής μεθόδου, η οποία θα επάγει την θνησιμότητα στα έντομα στο εμβρυικό στάδιο και θα ξεπερνά τους περιορισμούς που αναφέρθηκαν προηγουμένως για τις μεθόδους RIDL και SIT, οδήγησε στην ανάπτυξη του συστήματος Θηλεο-ειδικής εμβρυικής θνησιμότητας (Female-Specific Embryonic Lethality System, FSEL).

Πρόκειται για ένα σύστημα που δρα σε πρώιμο στάδιο της ανάπτυξης του εντόμου, συνδυάζοντας την αρχή της θηλεο-ειδικής θνησιμότητας μέσω εναλλακτικού ματίσματος με ένα έμβρυο-ειδικό σύστημα (Schetelig et al., 2009; Fu et al., 2007). Το σύστημα FSEL εφαρμόστηκε στη μύγα της μεσογείου *C. capitata* και όπως ήταν επιθυμητό είχε ως συνέπεια τη θανάτωση μόνο των θηλυκών που έφεραν την διαγονιδιακή κατασκευή. Στην διαγονιδιακή κατασκευή χρησιμοποιείται ένας έμβρυο-ειδικός υποκινητής που επάγει την έκφραση του trans-ενεργοποιητή που καταστέλλεται από το αντιβιοτικό τετρακυκλίνη (tetracycline-repressible transactivator, tTA) στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια του εμβρύου. Όταν ο ενεργοποιητής tTA εκφραστεί, προσδένεται στη περιοχή απόκρισης στη τετρακυκλίνη TRE (Tetracycline-Response Element), η οποία ελέγχει την έκφραση του προαποπτωτικού γονιδίου *hid*. Ωστόσο, το φύλο-ειδικό μάτισμα (sex specific splicing) του ιντρονίου *Cctra-I* εμποδίζει τη θνησιγόνο δράση του *hid* στα αρσενικά άτομα (Fu et al., 2007; Ogaugwu et al., 2012)



Εικόνα 1.11: Χρήση θηλεο-ειδικού ματίσματος υπό τον έλεγχο του συστήματος tTA. Το σύστημα που απεικονίζεται παρουσιάζει την κατασκευή ενός διαγονιδίου που χρησιμοποιεί ένα φυλο-ειδικό ιντρόνιο και ένα προαποπτωτικό γονίδιο για να δημιουργηθεί θηλεο-ειδική θνησιμότητα υπό τον έλεγχο του ενεργοποιητή tTA. Για να επιτευχθεί εμβρυική θνησιμότητα, το tTA βρίσκεται υπό τον έλεγχο ενός υποκινητή γονιδίου πρώιμης ανάπτυξης. Κατά τη διάρκεια της εκτροφής τέτοιων στελεχών, η προσθήκη τετρακυκλίνης (TET) στη τροφή διατηρεί το σύστημα απενεργοποιημένο (OFF), καθώς η τετρακυκλίνη συνδέεται στο σύστημα απόκρισης σε αυτήν (TRE). Κατά την απελευθέρωση η απουσία τετρακυκλίνης ενεργοποιεί το σύστημα. Στα αρσενικά, το αρρενο-ειδικό μάτισμα του ιντρονίου (*tra-I*), το τοποθετεί μετά το κωδικόνιο έναρξης (ATG) του γονιδίου τελεστή. Το ιντρόνιο *tra-I* περιέχει ένα μικρό εξόνιο, το οποίο περιέχει ένα κωδικόνιο λήξης (TAA) μεταξύ του κωδικονίου έναρξης και της υπόλοιπης αλληλουχίας και επομένως εμποδίζει τη δράση του προ-αποπτωτικού γονιδίου στα αρσενικά. Το θηλεο-ειδικό μάτισμα του ιντρονίου *tra-I* επιτρέπει την παραγωγή μιας λειτουργικής πρωτεΐνης και το εμβρυικά κύτταρα οδηγούνται στην απόπτωση (Eckermann et al., 2014).

Η εφαρμογή του συστήματος FSEL, παρόλο που δεν φαίνεται να αντιμετωπίζει σημαντικά εμπόδια στη δημιουργία του, προϋποθέτει την ύπαρξη βελτιώσεων ώστε να εφαρμοστεί σε ευρεία κλίμακα. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι δρα σε εμβρυικό στάδιο και όχι στο στάδιο της προνύμφης όπως συμβαίνει στη μέθοδο RIDL. Επίσης, με αυτόν τον τρόπο μειώνεται το κόστος της εφαρμογής, αφού τα στάδια της προνύμφης και της νύμφης δεν μεσολαβούν, αυξάνοντας έτσι την αποδοτικότητα παράλληλα μειώνοντας το κόστος της μαζικής εκτροφής των εντόμων (Ogaugwu et al., 2012)

Η δημιουργία μιας αντίστοιχης κατασκευής και σε άλλα είδη εντόμων προϋποθέτει την απομόνωση και ταυτοποίηση αλληλουχιών γονιδίων που εμπλέκονται τόσο στην εμβρυογένεση όσο και στην αποπτωτική διαδικασία. Στο σύστημα FSEL, τα θνησιγόνα ή αποπτωτικά γονίδια βρίσκονται υπό τον έλεγχο ενός εξειδικευμένου υποκινητή, όπως είναι ο υποκινητής του γονιδίου *serendipity-alpha (sry-a)*, το οποίο εκφράζεται μόνο στο στάδιο του συγκυτιακού βλαστοδέρματος κατά τη διαδικασία της εμβρυογένεσης. Ο έμβρυο-ειδικός υποκινητής χρησιμοποιείται προκειμένου οι απόγονοι των εντόμων να πεθαίνουν στο στάδιο της εμβρυογένεσης, για να εξασφαλιστεί η διακοπή της ανάπτυξης με αποτέλεσμα την αποφυγή της καταστροφής του καρπού.

1.9 Η εμβρυογένεση στη *Drosophila*

Η μύγα του ξιδιού *Drosophila melanogaster* ήταν ο πρώτος οργανισμός του οποίου η ανάπτυξη κατανοήθηκε σε μοριακό επίπεδο. Όπως και ο δάκος *B. oleae* και η *Drosophila* είναι ένα ολομετάβολο έντομο, το οποίο χαρακτηρίζεται από 4 αναπτυξιακά στάδια: α) αυγό (egg), β) προνύμφη (larva), γ) νύμφη (pupa) και δ) ακμαίο-ενήλικο έντομο (adult).

Η *D. melanogaster* αποτελεί το καλύτερα μελετημένο και κατανοητό αναπτυξιακό σύστημα στα έντομα για αυτό και έχει καθιερωθεί ως οργανισμός-μοντέλο. Σε αυτό συνετέλεσαν πολλοί παράγοντες όπως: η πληθώρα των διαθέσιμων μεταλλάξεων, ο συνδυασμός φαινοτύπου και μοριακής ανάλυσης των γονιδιακών μεταλλάξεων, η αποκωδικοποίηση του γονιδιώματός της (Adams et al., 2000) η ανάπτυξη αξιόπιστης και εύκολης τεχνικής για μετασχηματισμό ατόμων (Spradling and Rubin, 1982), η ανάπτυξη τεχνικής για *in situ* υβριδοποίηση σε ολόκληρα έμβρυα (Tautz and Pfeifle, 1989), η διαθεσιμότητα ποικιλίας αντισωμάτων και στελεχών παγίδευσης ενισχυτών και επαγωγής εκτοπικής έκφρασης (O'Kane and Gehring, 1987). Όλα τα προηγούμενα συνετέλεσαν στην κατανόηση πολλών αναπτυξιακών μηχανισμών και αλληλεπιδράσεων γονιδίων.

Η εμβρυϊκή ανάπτυξη είναι μια συνεχής διαδικασία κατά την οποία συμβαίνουν ριζικές και σημαντικές αλλαγές σε μια πρωταρχική μορφή ζωής, το γονιμοποιημένο ωάριο, οι οποίες οδηγούν στη δημιουργία ενός ολοκληρωμένου οργανισμού μέσα σε καθορισμένο χρόνο. Στη *Drosophila* τα βασικότερα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης περιλαμβάνουν σύμφωνα με τους Campos-Ortega and Hartenstein, 1997 και Bate and MartinezArias, 1993:

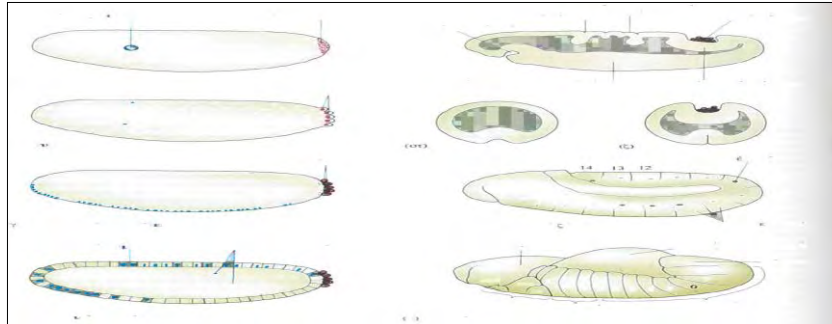
1. το σχηματισμό του συγκυτιακού βλαστοδέρματος
2. τη διαφοροποίηση των πολικών κυττάρων, τα οποία θα σχηματίσουν τις γονάδες και την κυτταροποίηση του βλαστοδέρματος
3. τη γαστριδίωση (κατά την οποία διαφοροποιούνται το ενδόδερμα, το μεσόδερμα, το μεσοεξώδερμα και το εξώδερμα)
4. την επιμήκυνση της βλαστικής ζώνης (κατά την οποία διαφοροποιούνται τα τμήματα του πεπτικού συστήματος: οισοφάγος, μεσέντερο και ορθό έντερο, σχηματίζονται οι νευροβλάστες και τα γλοία κύτταρα, καθώς και τα τραχειακά κοιλώματα, από τα οποία θα προκύψει το τραχειακό σύστημα)
5. τη σύμπτυξη της βλαστικής ζώνης (κατά την οποία συμβαίνει η τμηματοποίηση του εμβρύου με την οποία παίρνει τη μορφή της προνύμφης, σχηματίζεται ο πεπτικός σωλήνας, αναπτύσσονται το τραχειακό και το νευρικό σύστημα και σχηματίζονται οι γονάδες)
6. την ανάπτυξη του κεφαλιού και την ολοκλήρωση της μορφογένεσης με τη ραχιαία συρραφή. Κατά τις τελευταίες αυτές μορφογενετικές κινήσεις, κλείνει το ραχιαίο

Εικόνα 1.12: Διαγραμματική απεικόνιση των βασικότερων σταδίων της εμβρυογένεσης στη *Drosophila* (Campos-Ortega and Hartenstein, 1997). Το στάδιο 5 απεικονίζει το βλαστοόδερμα με τα πολικά κύτταρα (*pc*). Το στάδιο 6 δείχνει τη γαστριδίωση, τα στάδια 7-11 την επιμήκυνση της βλαστικής ζώνης, τα στάδια 12-14 την σύμπτυξη της βλαστικής ζώνης και τα στάδια 14-17 την τελειοποίηση του κεφαλιού. Στο στάδιο 17 το έμβρυο είναι πλήρως ανεπτυγμένο.

- *ms* μεσόδερμα
- *nhc* νευρική χορδή,
- *tr* τραχειακά κοιλώματα
- *mg* μεσέντερο
- *hg* ορθό έντερο,
- *sg* σιελογόνοι αδένες
- *ph* φάρυγγας
- *go* γονάδες.

Μετά τις οκτώ πρώτες διαιρέσεις, στο οπίσθιο άκρο του εμβρύου σχηματίζονται τα πολικά κύτταρα, από τα οποία προκύπτουν τα γαμετικά κύτταρα. Ύστερα από εννιά διαιρέσεις, οι περισσότεροι πυρήνες μεταναστεύουν στην περιφέρεια του συγκυτίου, όπου σχηματίζεται το συγκυτιακό βλαστώδερμα, ενώ αυτοί που παραμένουν στο εσωτερικό ενσωματώνονται στα βιτελλοφάγα, που καταλήγουν στον εντερικό αυλό. Περίπου τρεις ώρες μετά την γονιμοποίηση, αναπτύσσονται κυτταρικές μεμβράνες από την πλασματική μεμβράνη του εμβρύου προς το εσωτερικό διαχωρίζοντας του πυρήνες και σχηματίζεται το κυτταρικό βλαστώδερμα. Στη συνέχεια, ξεκινά η γαστρίδωση, με το σχηματισμό μιας βαθιάς σχισμής της κοιλιακής αύλακας που εμφανίζεται στο μεγαλύτερο μέρος του εμβρύου. Η αύλακα αυτή συνιστάται σε μια μεσοδερμική εγκόλπωση κατά μήκος της κοιλιακής μέσης γραμμής, η οποία εν συνεχεία συντήκεται στα άκρα με εγκολπώσεις του εμπρόσθιου και του οπίσθιου μέσου εντέρου. Η κεφαλική αύλακα σχηματίζεται ενώ ταυτόχρονα με την γαστρίδωση, η βλαστική ζώνη αρχίζει να επιμηκύνεται, οδηγώντας το οπίσθιο άκρο με τα πολικά κύτταρα στη ραχιαία πλευρά του εμβρύου. Μετά από τέσσερις περίπου ώρες εμφανίζονται οι πρώτοι νευροβλάστες.

Με την ολοκλήρωση της εμβρυϊκής ανάπτυξης, η ανάπτυξη του ατόμου συνεχίζεται στα προνυμφικά στάδια. Η σωστή ανάπτυξη και λειτουργία ενός οργανισμού εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την έκφραση και λειτουργία των κατάλληλων γονιδίων κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Για το λόγο αυτό έχει μελετηθεί το πρότυπο έκφρασης και οι αλληλεπιδράσεις διαφόρων γονιδίων κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη της *Drosophila*.



Εικόνα 1.13: Η πρώιμη ανάπτυξη της *Drosophila* (Βασικές Αρχές Βιολογίας Ανάπτυξης, J.M.W SLACK 2η έκδ) .

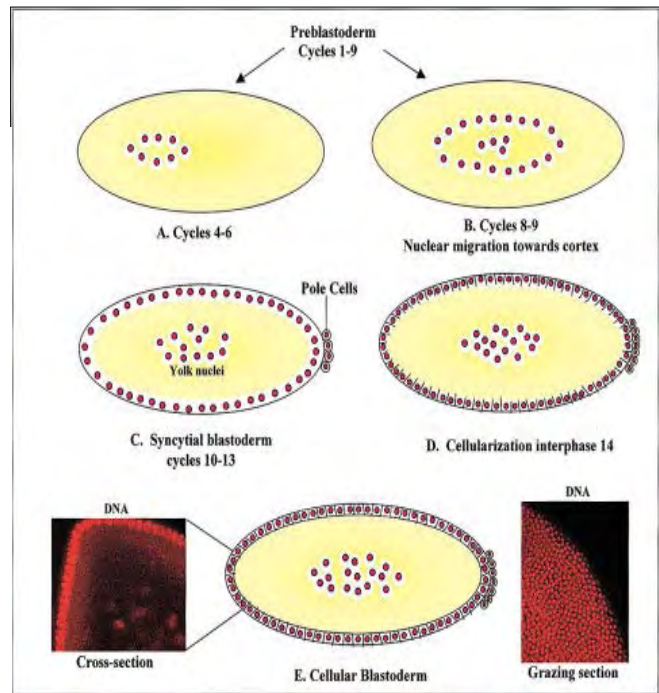
1.10 Το στάδιο της κυτταροποίησης

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, στα αρχικά εμβρυϊκά αναπτυξιακά στάδια, το έμβρυο αποτελεί ένα συγκύτιο και ονομάζεται συγκυτιακό βλαστόδερμα. Κάποια καθορισμένη χρονική στιγμή, οι πυρήνες θα μεταναστεύσουν προς την περιφέρεια και θα ξεκινήσει η κυτταροποίηση, ο διαχωρισμός δηλαδή, του πολύ-πυρηνικού κυττάρου ή συγκυτίου σε μεμονωμένα κύτταρα δημιουργώντας ένα περιφερειακό κυτταρικό επιθήλιο, δίνοντας την δομή του κυτταρικού βλαστοδέρματος. Η κυτταροποίηση γενικά είναι η διαδικασία που οδηγεί στην μετατροπή του συγκυτιακού βλαστοδέρματος σε κυτταρικό βλαστόδερμα μέσω του σχηματισμού ενός δικτύου αυλακίων που δημιουργεί στο συγκύτιο μια μονοστοιβάδα περίπου 6.000 κυττάρων που μοιάζουν με επιθηλιακά.

Οι πρώτες 13 μιτωτικές διαιρέσεις του εμβρύου της *Drosophila* συμβαίνουν συγχρονισμένα στο κυτταρόπλασμα του συγκυτίου χωρίς την ύπαρξη κυτταροκίνησης. Οι περισσότεροι πυρήνες εντοπίζονται στο κέντρο του αυγού και μοιράζονται το κοινό κυτταρόπλασμα. Κατά τον 7^ο με 10^ο κύκλο μεταναστεύουν προς τον φλοιό σχηματίζοντας το συγκυτιακό βλαστόδερμα και στο κέντρο απομένουν μόνο 26 από τους 128 που καταλήγουν στον εντερικό αυλό. Μετά από 8 περίπου διαιρέσεις οι πυρήνες που καταλήγουν στον οπίσθιο άκρο του εμβρύου θα σχηματίζουν τα πολικά κύτταρα. Οι υπόλοιποι πυρήνες (σωματικοί) σχηματίζουν μια μονοστοιβάδα στο φλοιό και υφίστανται τρεις ακόμα πυρηνικές διαιρέσεις (κύκλοι 11 έως 13) για να σχηματίσουν τελικά ένα φλοιώδες στρώμα περίπου 6.000 σωματικών πυρήνων (2 ώρες έως 2 ώρες και 50 λεπτά μετά τη γονιμοποίηση). Κάθε πυρήνας περιβάλλεται από τη δική του εξατομικευμένη κυτταροπλασματική περιοχή (Karr and Alberts, 1986). Αυτή η κυτταροπλασματική περιοχή σχηματίζει ένα κάλυμμα πάνω από τον πυρήνα, το οποίο εμφανίζεται ως μια διόγκωση στην επιφάνεια του εμβρύου. Η διαδικασία της κυτταροποίησης αρχίζει στη μετάφαση της 14ης διαιρέσεως και διαρκεί περίπου 65 με 70 λεπτά. Κατά τη διάρκεια αυτής της μετάφασης, κάθε καπάκι εκτείνεται και χωρίζεται σε δύο θυγατρικά καλύμματα πριν από την πυρηνική διαιρέση, ενώ παράλληλα μια εγκολπώση της μεμβράνης εμφανίζεται γύρω από κάθε διαιρούμενο πυρήνα. Οι μεμβρανικές εγκολπώσεις υποχωρούν κατά τη διάρκεια της τελόφασης ενώ παράλληλα τα δύο καλύμματα ενωμένα με

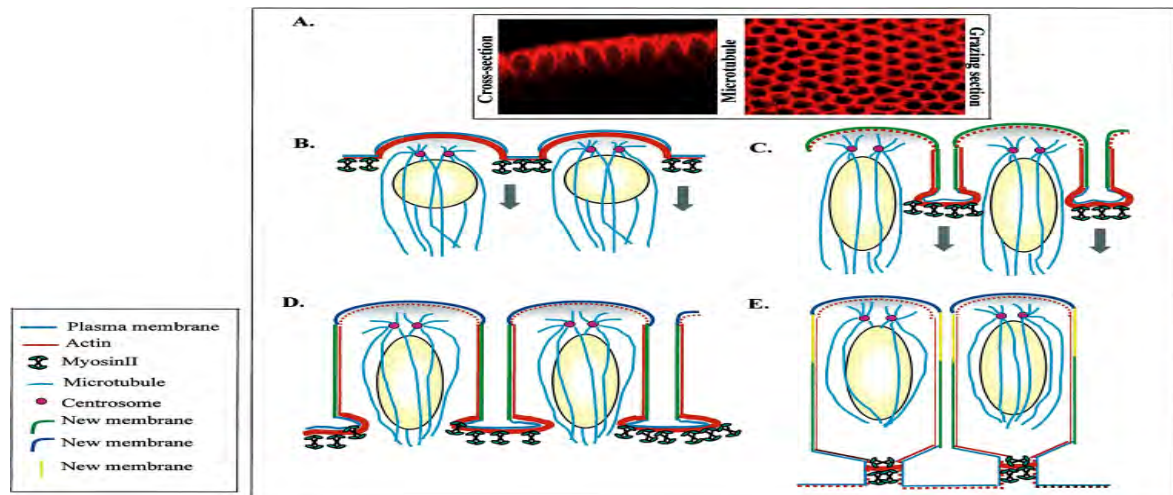
τους θυγατρικούς πυρήνες μετασχηματίζονται για να σχηματιστούν τα διαχωριστικά αυλάκια κατά τον 13^ο μιτωτικό κύκλο, τα οποία αλληλεπιδρούν με το σύμπλοκο ακτίνης-μυοσίνης II και αναφέρονται στη βιβλιογραφία ως παροδικά διαχωριστικά αυλάκια (Scheisguth et al., 1990). Επιπλέον, η ενδοανάπτυξη των μεμβρανών απαιτεί έναν αριθμό πρωτεϊνών και άλλων μεμβρανικών συστατικών, τα οποία στρατολογούνται μέσω ενός μονοπατιού στο οποίο κύριο ρόλο παίζουν οι μικροσωληνίσκοι.

Εικόνα 1.14: Ο σχηματισμός του κυτταρικού βλαστοδέρματος στη *D. melanogaster*. A: Η αξονική κίνηση των πυρήνων κατά τη διάρκεια των κύκλων 4-6. B: Η πυρηνική μετανάστευση προς το φλοιό κατά διάρκεια των κύκλων 8 και 9. C: Η πλειονότητα των φτάνει στην περιοχή του φλοιού αφήνοντας πίσω κάποιους λιγοστούς πυρήνες. D-E: Η κυτταροποίηση αρχίζει κατά τη διάρκεια του 14ου κύκλου, όπου δημιουργούνται μεμβράνες μεταξύ των πυρήνων προς σχηματισμό 6.000 βλαστοδερμικών κυττάρων. Εκατέρωθεν, παρουσιάζονται εικόνες που ελήφθησαν με συνεστιακή απεικόνιση σε τομές του εμβρύου της *D.melanogaster* και χρησιμοποιήθηκε ιωδιούχο προπιδίο (PI, propidium iodide) για τη σήμανση του DNA.



Η κυτταροποίηση σηματοδοτείται με την αύξηση της επιφάνειας της κυτταρικής μεμβράνης και τον σχηματισμό λαχνών ανάμεσα στους γειτονικούς πυρήνες, οι οποίες επιμηκύνονται σχηματίζοντας εξαγωνικές συστοιχίες από διαχωριστικά αυλάκια. Η διαδικασία της κυτταροποίησης συνηθίζεται να χωρίζεται σε δύο φάσεις ανάλογα με τον ρυθμό προόδου των διαχωριστικών αυλακίων στο φλοιώδες κυτταρόπλασμα. Έτσι έχουμε αρχικά την «αργή φάση» (35 λεπτά) και έπειτα τη «γρήγορη φάση» (20 λεπτά). Οι διαφορές αυτές στον ρυθμό της κυτταροποίηση πιθανότατα αντικατοπτρίζουν διαφορετικούς μηχανισμούς κατά τον σχηματισμό των αυλακίων (Merril et al., 1988). Οι μικροσωληνίσκοι, τα νημάτια ακτίνης και η μυοσίνη II παίζουν καταλυτικό ρόλο στην ολοκλήρωση της διαδικασίας της κυτταροποίησης. Στην έναρξη της 14ης μιτωτικής διαίρεσης, μικροσωληνίσκοι που προκύπτουν από ζεύγη κεντροσωμάτων στο κορυφαίο άκρο και εκτείνονται προς τα συν-άκρα, προς το εσωτερικό του εμβρύου, καλύπτουν τους πυρήνες (σαν ανεστραμμένα καλάθια) (Kellog et al., 1991). Αυτή η διαδικασία είναι απαραίτητη. Σε περίπτωση μικροέγχυσης στο έμβρυο με κολσεμίδη, κατά τη διάρκεια της 14ης μίτωσης ή της αργής φάσης, η μετακίνηση προς το εσωτερικό του αυλακίου σταματά. Αντίθετα, η μικροέγχυση κολχικίνης στο έμβρυο κατά τη διάρκεια της γρήγορης φάσης δεν επηρέασε την εγκόλπωση της μεμβράνης. Αναλυτικότερα, κατά την αργή φάση νημάτια ακτίνης (F-ακτίνη) συσσωρεύονται στο φλοιό και συνδέονται με τις νεοσχηματισμένες λάχνες, οι οποίες θα αποτελέσουν τα αρχικά αυλάκια. Στη συνέχεια,

σχηματίζεται το σύμπλοκο ακτίνης-μυοσίνης που εντοπίζεται στο εσωτερικό άκρο του αυλακίου επιμηκύνοντας προς σχηματισμό της πλασματικής μεμβράνης ανάμεσα σε δύο πυρήνες και το κλείσιμο της στο τέλος της διαδικασίας με την σύντηξη διαδοχικών νεοσυντιθέμενων ενδομεμβρανών. Έτσι, δημιουργούνται οι πλευρικές μεμβράνες, ώστε να ξεχωρίσει ο πυρήνας αυτός από τους γειτονικούς του και να προκύψει ένα μεμονωμένο κύτταρο. Αυτό γίνεται με τον σχηματισμό του καναλιού του αυλακίου και την πρόοδό του ως στη βάση του πυρήνα, με διαχωρισμό των εναποτιθέμενων μεμβρανών.



Εικόνα 1.15: Συντονισμός των μικροσωληνίσκων, των νηματίων ακτίνης και της μυοσίνης κατά τη διαδικασία της κυτταροποίησης του βλαστώδερμα. Α: Συνεστιακή απεικόνιση της κυτταροποίησης εμβρύων σημασμένα με αντίσωμα αντί-άλφα τουμπουλίνης. Β: Φάση 1: ξεκινά με το σχηματισμό του αυλακίου και σύνδεση με το σύμπλοκο ακτίνης-μυοσίνης. Γ: Κατά τη διάρκεια της φάσης 2, η συγκέντρωση του ακτίνης αυξάνεται στα αυλάκια των καναλιών. Δημιουργία νέων ενθεμάτων μεμβράνης ενώ η "παλιά" περιορίζεται στα αυλάκια. Δ: το σύμπλοκο ακτίνης-μυοσίνης φτάνει στο άκρο της βάσης των πυρήνων Ε: Στην φάση 4, οι νέες μεμβράνες εναποτίθενται πλευρικά και η διάμετρος της συσταλτικής συσκευής ακτίνης-μυοσίνης μειώνεται σταδιακά.

Προς το τέλος της κυτταροποίησης, η διάμετρος των καναλιών μειώνεται και σχηματίζεται μία δομή όμοια με δαχτυλίδι ή συσταλτό δακτύλιο, η οποία περιβάλλει το κανάλι του αυλακίου και τελικά το σύμπλοκο ακτίνης-μυοσίνης που συγκροτεί το δαχτυλίδι θα αποκοπεί στο νεοσυσταθέν κύτταρο. Η κορυφαία επιφάνεια γίνεται επίπεδη κατά την έναρξη της γρήγορης φάσης, όταν η συσσωρευμένη στις λάχνες πλασματική μεμβράνη προχωρά προς το εσωτερικό, στο διαχωριστικό κανάλι. Η αλλαγή αυτή της κορυφαίας επιφάνειας δίνει το μισό περίπου απόθεμα σε πλασματική μεμβράνη για το κλείσιμο των νέων σωματικών κυττάρων (Fullilove and Jacobson, 1971; Schweisguth et al., 1990).

1.11 Η διαδικασία της εμβρυογένεσης στα υπόλοιπα είδη εντόμων

Η εμβρυογένεση όπως αναλύθηκε μέχρι στιγμής στο οργανισμό-μοντέλο *D.melanogaster* χαρακτηρίζει σε γενικές γραμμές τη διαδικασία της εμβρυογένεσης και στα υπόλοιπα είδη εντόμων. Παρόλα αυτά, πέρα από τις πολλές ομοιότητες στη διαδικασία και στους μοριακούς μηχανισμούς υπάρχουν και διαφορές, οι οποίες δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως στα διάφορα είδη εντόμων. Στη μελέτη των Gabrielli et al (2010) διερευνήθηκε η γονιδιακή έκφραση επιλεγμένων γονιδίων, σύμφωνα με τη χρονική διαδοχή των σταδίων που

είχε ήδη καθοριστεί στη μύγα της Μεσογείου, *C. capitata* (Schetelig et al., 2007). Συγκεκριμένα, ενώ το στάδιο της κυτταροποίησης στη *D. melanogaster* λαμβάνει χώρα 2 ώρες και 10 λεπτά μετά τη γονιμοποίηση και ολοκληρώνεται στις 2 ώρες και 40 λεπτά, στη *C. capitata* συμβαίνει αργότερα, 9 ώρες μετά την ωοαπόθεση και έχει μεγαλύτερη διάρκεια, καθώς ολοκληρώνεται 12 ώρες μετά τη γονιμοποίηση και δεν παρατηρείται η τυπική επιμήκυνση των πυρήνων κατά τη διάρκεια της αργής φάσης. Τέλος, συνολικά η διάρκεια της εμβρυογένεσης στη *Drosophila* είναι 24 ώρες, ενώ η εκκόλαψη στη *C. capitata* διαρκεί 48 ώρες (Lecuit and Wieschaus, 2000). Στο *B. oleae*, το εβρυογενετικό στάδιο διαρκεί περίπου 60 ώρες.

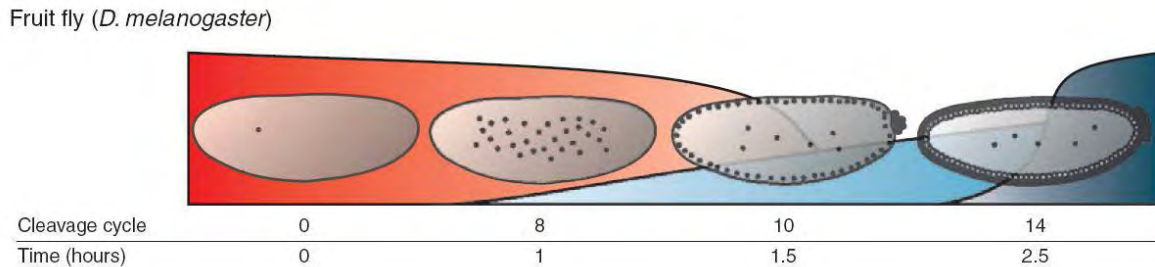
Η εμβρυογένεση στο *B. oleae* χωρίζεται σε τρία βασικά στάδια. Το πρώτο στάδιο αφορά την ωρίμανση του ωαρίου και το σχηματισμό του ζυγωτού. Σε αυτό το στάδιο, το αυγό είναι ομοιόμορφα μαύρο στο κέντρο και λευκό στην περιφέρεια. Από τη μικροπύλη γίνεται η είσοδος του σπερματοζωαρίου. Στο μικροσκόπιο παρατηρείται η δημιουργία ενός κενού εσωτερικά της μεμβράνης του αυγού. Το χορίο παρουσιάζει καλά ανεπτυγμένο δίκτυο αυλακίων σε οργάνωση εξαγώνου, το οποίο καλύπτει ολόκληρο το αυγό. Το στάδιο αυτό διαρκεί περίπου 15 με 20 λεπτά. Το δεύτερο στάδιο είναι ο σχηματισμός του βλαστοδέρματος και η γαστριδίωση. Η κυτταροποίηση αρχίζει στις 6 ώρες μετά τη γονιμοποίηση. Τα πολικά κύτταρα σχηματίζονται στο οπίσθιο μέρος του αυγού. Μετά από 10 ώρες σχηματίζονται τα βλαστικά κύτταρα στην περίμετρο του αυγού και επιτυγχάνεται η ολοκλήρωση του σχηματισμού του βλαστοδέρματος. Το τρίτο στάδιο είναι το στάδιο της οργανογένεσης. Ο σχηματισμός του κοιλιακού αυλακίου αρχίζει μετά από 22 ώρες ενώ ο σχηματισμός της κεφαλικής σχισμής μετά από 28 ώρες. Το κεφάλι και ο γαστρικός σωλήνας σχηματίζονται στις 46 ώρες ενώ μέχρι τις 60 ώρες έχουμε πλήρη σχηματισμό όλων των οργάνων του εμβρύου (Hanife, 2014).

1.12 Γονίδια που εμπλέκονται στην κυτταροποίηση

Το αρχικό έναυσμα για την έναρξη της κυτταροποίησης δεν είναι ακόμα γνωστό, όμως έχουν βρεθεί προϊόντα ζυγωτικά μεταγραφόμενων γονιδίων, τα οποία φαίνεται να συμμετέχουν σε αυτή τη διαδικασία. Η μεταγραφή των ζυγωτικών γονιδίων ξεκινά από την 11^η μίτωση, αυξάνεται μέχρι και τη 14^η μίτωση και μειώνεται μετά το τέλος της κυτταροποίησης (Mazumdar et al., 2002). Σε πειράματα, στο οποία εγχύεται ο αναστολέας της μεταγραφής α-αμανιτίνη (*a-amanitin*), κατά της διάρκειας της 13^{ης} μίτωσης ή και νωρίτερα, παρεμποδίζεται πλήρως η κυτταροποίηση υποδεικνύοντας ότι για αυτή τη διαδικασία είναι σημαντική η μεταγραφή ορισμένων γονιδίων (Edgar et al., 1986).

Η έναρξη της εμβρυϊκής ανάπτυξης είναι το αποτέλεσμα μιας περίπλοκης αλληλεπίδρασης μεταξύ μητρικών και ζυγωτικών γενετικών πληροφοριών. Κατά τη διάρκεια της μετάβασης από τα μητρικά στα ζυγωτικά γονίδια (*maternal-to-zygotic-transition*, MZT) τα έμβρυα ενσωματώνουν μετα-μεταγραφικές ρυθμίσεις των μητρικών μεταγράφων με μεταγραφική ενεργοποίηση του ζυγωτικού γονιδιώματος (Gouw et al., 2009). Στη *Drosophila melanogaster*, τα μητρικά μετάγραφα και οι πρωτεΐνες εναποτίθενται στο αυγό κατά τη διάρκεια της ωογένεσης και παρατηρούνται δύο κύματα μεταγράφων ζυγωτικών γονιδίων στα έμβρυα. Το πρώτο μικρό κύμα συμβαίνει μεταξύ της 1^{ης} και 2^{ης} ενώ το δεύτερο μεγάλο κύμα μεταξύ 2^{ης} και 3^{ης} ώρας μετά τη γονιμοποίηση (Liang et al., 2008).

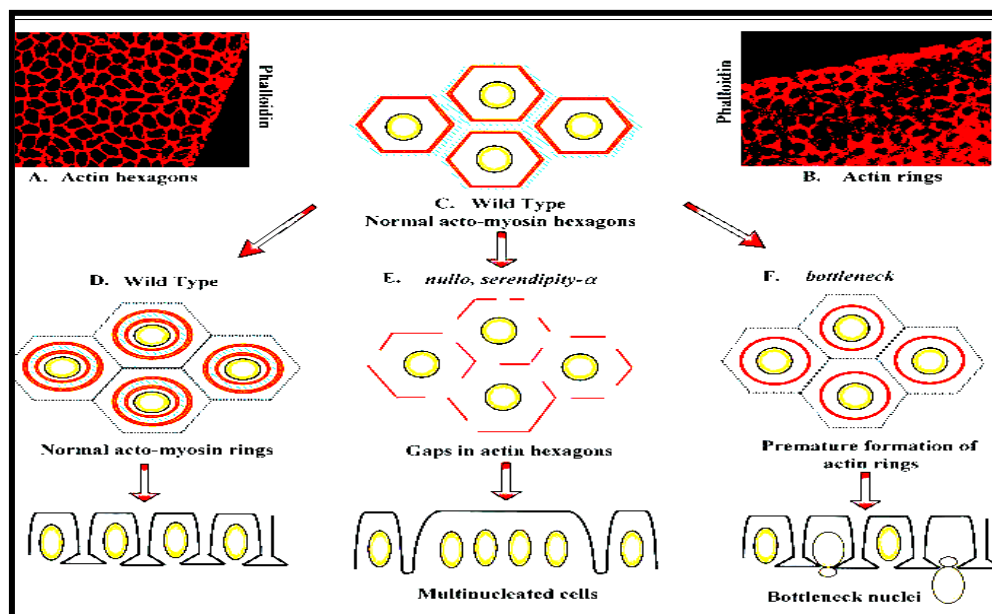
Το προφίλ έκφρασης τουλάχιστον του ενός τρίτου των ενεργών ζυγωτικών γονιδίων, είναι συζευγμένο με την αποικοδόμηση του αντίστοιχου mRNA της μητέρας όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 1.16 (Tadros and Lipshitz, 2009).



Εικόνα 1.16: Σχηματική απεικόνιση του φαινομένου της μετάβασης από τα μητρικά στα ζυγωτικά γονίδια (MZT) στη *D. melanogaster*. Κάτω από κάθε μιτωτικό κύκλο αναγράφεται το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί μετά τη γονιμοποίηση. Οι κόκκινες καμπύλες αντιπροσωπεύουν το προφίλ της αποικοδόμησης των αποσταθεροποιημένων μητρικών μεταγράφων. Το γαλάζιο και το σκούρο μπλε δείχνουν, αντίστοιχα, το μικρό και το μεγάλο κύμα ενεργοποίησης των ζυγωτικών γονιδίων.

Κατά τη διάρκεια του σταδίου του συγκυτιακού βλαστοδέρματος, στο οποίο σχηματίζονται οι δομές στα ψευδο-διαχωριστικά αυλάκια, εγκαθιδρύεται το πλαίσιο πάνω στο οποίο θα σχηματιστούν οι κυτταρικές μεμβράνες. Τόσο τα μητρικά όσο και τα ζυγωτικά γονίδια είναι απαραίτητα για την ολοκλήρωση της διαδικασίας της κυτταροποίησης. Παρόλα αυτά, τα περισσότερα από τα κυτταροσκελετικά συστατικά αποτελούν προϊόντα έκφρασης μητρικών γονιδίων με εξαίρεση τα τρία ζυγωτικά γονίδια: το *nullo* (Hunter et al., 2002), το *serendipity-alpha* (Ibnsouda et al., 1993) και το *bottleneck* (Theurkauf, 1994). Ακόμα, η ερευνητική ομάδα του Lecuit ανακάλυψε ένα νέο ζυγωτικά εκφραζόμενο γονίδιο, το *slow-as-molasses* (*slam*), το οποίο χρειάζεται για την πόλωση στην ανάπτυξη των βασεοπλευρικών μεμβρανών.

Η δομική σταθερότητα του εξαγώνου της ακτίνης κατά τη διάρκεια της αργής φάσης της κυτταροποίησης εξαρτάται από τα τρία ζυγωτικά γονίδια *nullo*, *sry-a* και *bottleneck*. Τα προϊόντα των τριών αυτών γονιδίων αλληλεπιδρούν με τα νήματα της ακτίνης (actin filaments) στα έμβρυα αγρίου τύπου. Ο κατάλληλος κυτταρικός εντοπισμός, στην εξαγωνική περιοχή του συμπλόκου ακτίνης-μυοσίνης, του προϊόντος που παράγεται από το γονίδιο *sry-a* καθορίζεται από το *nullo*. Η απουσία των γονιδίων *sry-a* και του *nullo* έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία κενών στην εξαγωνική περιοχή και κατά συνέπεια τη παραγωγή πολυπύρηνων κυττάρων (Εικόνα 1.16Ε). Παρόλα αυτά, τα μεταλλάγματα του γονιδίου *nullo* διαφέρουν από αυτά του *sry-a* καθώς σε αυτά συναντώνται περισσότερα πολυπύρηννα κύτταρα. Στα μεταλλάγματα του γονιδίου *bottleneck*, τα εξάγωνα μετατρέπονται νωρίτερα σε δακτυλίους, με αποτέλεσμα τη δημιουργία πυρήνων που έχουν σχήμα φιάλης (bottle-shaped). Οι παρατηρήσεις αυτές οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι το προϊόν του *bottleneck* δρα ως ένα παροδικός ρυθμιστής της δομικής αλλαγής, από εξάγωνα σε δακτυλίους (Εικόνα 1.16F).



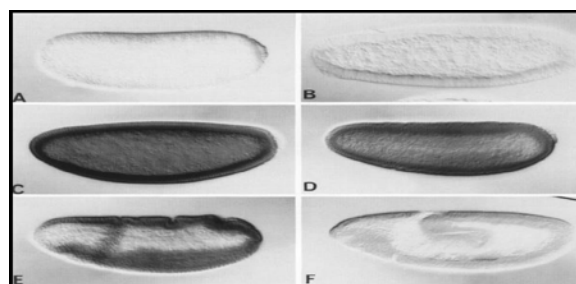
Εικόνα 1.16: Η συμμετοχή της ακτίνης στην κυτταροποίηση του βλαστοδέρματος. Α: Επιφανειακή απεικόνιση τμήματος εμβρύου όπου αποκαλύπτονται τα εξάγωνα ακτίνης με τη χρώση phalloidin. Β: Τα εξάγωνα ακτίνης μετατρέπονται σε δακτυλίους κατά τη διάρκεια της κυτταροποίησης. Γ: Σχηματική απεικόνιση φυσιολογικού εξαγώνου ακτίνης-μυοσίνης σε έμβρυα αγρίου τύπου. Δ: Σχηματικό διάγραμμα της μετατροπής των εξαγώνων σε δακτυλίους σε έμβρυα αγρίου τύπου Ε: Σχηματικό διάγραμμα της μετατροπής των εξαγώνων σε δακτυλίους σε μεταλλάγματα *nullo* και *sry-a* όπου δημιουργούνται κενά στα εξάγωνα της ακτίνης με αποτέλεσμα τη δημιουργία πολυπύρηνων κυττάρων. F: Τέλος, στα μεταλλάγματα *bottleneck* στα οποία υπάρχει πρόωρος σχηματισμός των δακτυλίων ακτίνης παρατηρείται το χαρακτηριστικό σχήμα φιάλης.

Η πρωτεΐνη Nullο δρα για να σταθεροποίηση της συγκέντρωσης της καδερίνης και της κατενίνης στις αναπτυσσόμενες βασικές μεμβράνες. Αντίθετα, η πρωτεΐνη Slam χρειάζεται για τη ρύθμιση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών β -κατενίνη/ Armantillo και Disc-lost (Lecuit et al., 2002, Beronja et al., 2002). Στα μεταλλάγματα του γονιδίου *slam*, τα επίπεδα της μυοσίνης στα αυλάκια των καναλιών ήταν μειωμένα. Η πρωτεΐνη Disc-lost (Dlt) παίζει κρίσιμο ρόλο στην πόλωση των εμβρυικών επιθηλίων κατά τον σχηματισμό του κυτταρικού βλαστοδέρματος (Loncar and Singer, 1995).

Εμβρυικά μεταλλάγματα του *nuclear fallout* (*nuf*), ενός μητρικά μεταγραφόμενου γονιδίου και κεντροσωμικής πρωτεΐνης έχουν παρόμοιο φαινότυπο με τα μεταλλάγματα του *nullo* και του *sry-a*. Τα μεταλλάγματα του *nuf* παρουσιάζουν μη ολοκληρωμένο μεταφασικό σχηματισμό αυλακίου επιτρέποντας στους γειτονικούς πυρήνες να συγκρουστούν με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιτωτικών ατελειών. Η πρωτεΐνη Nuf επίσης μεταφέρει την ακτίνη και άλλες πρωτεΐνες όπως η DAH (Discontinuous Actin Hexagon) στα φλοιώδη αυλάκια μέσω μεμβρανικής μεταφοράς κατά μήκος των μικροσωληνίσκων (Rothwell et al., 1999). Η DAH είναι μια μεμβρανο-συνδεδεμένη πρωτεΐνη των κυτταροσκελετών ακτίνης στις αναπτυσσόμενες μεμβράνες κατά τη διάρκεια της κυτταροποίησης. Η αλληλεπίδραση της DAH με μεμβρανικές και συνδεδεμένες με την ακτίνη (actin-binding proteins) πρωτεΐνες ρυθμίζεται με φωσφοριλίωση (Zhang et al., 2000). Μια ακόμα πρωτεΐνη, η οποία παίζει κρίσιμο ρόλο σε κυτταρικές διαδικασίες όπου εμπλέκεται η ακτίνη συμπεριλαμβανομένης της κυτταροκίνησης είναι η πρωτεΐνη Diaphanous (Dia). Πρόκειται για μια πρωτεΐνη συνδεδεμένη με την ακτίνη, η οποία χρειάζεται στα νημάτια ακτίνης για την οργάνωση των μιτωτικών αυλακίων ή των αυλακίων της κυτταροποίησης (Afshar et al., 2000).

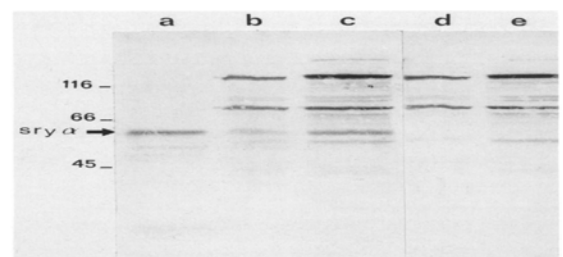
1.13 Ο ρόλος του γονιδίου *serendipity-alpha* στη διαδικασία της κυτταροποίησης

Στο πρώτο γονίδιο που έγινε προσπάθεια εύρεσης και απομόνωσης του υποκινητή του ήταν το γονίδιο *serendipity-alpha*. Το γονίδιο *sry-a* της *D. melanogaster* εντοπίζεται στο 3^ο χρωμόσωμα και μεταγράφεται κατά τον σχηματισμό του συγκυτιακού βλαστοδέρματος (κατά τον 11^ο μιτωτικό κύκλο). Υπάρχει σε μικρές ποσότητες κατά τον 12^ο και 13^ο μιτωτικό κύκλο, ενώ η μέγιστη συγκέντρωσή του συναντάται στο στάδιο της κυτταροποίησης και χάνεται μέχρι την έναρξη της γαστριδίωσης, δηλαδή εκφράζεται για μία μόνο ώρα κατά τη διάρκεια της ζωής της μύγας, χωρίς να απαιτείται η παρουσία του σε ολόκληρο το στάδιο της κυτταροκίνησης (Schweisguth et al., 1991; Schweisguth, 1989).



Εικόνα 1.17: Πρότυπα έκφρασης του γονιδίου *sry-a* στη *D. melanogaster* σε έμβρυα αγρίου τύπου, σε διαφορετικά στάδια της εμβρυογένεσης. A: Σχηματισμός πολικών κυττάρων. B: Συγκυτιακό βλαστόδερμα. C: Κυτταρικό βλαστόδερμα. D: Πρώιμη γαστριδίωση. E: Γαστριδίωση. F: Εκτεταμένη βλαστική ζώνη (Schweisguth, 1989)

Πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν πολυκλωνικά αντισώματα σε έμβρυα 2 έως 4 ωρών, βρέθηκε πως το προϊόν του γονιδίου είναι μια πρωτεΐνη 58-kD (Εικόνα 1.18), η οποία βρίσκεται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στο πρωτογενές εκχύλισμα της μεμβράνης (Schweisguth, 1989). Η πρωτεΐνη του *sry-a* συνδέεται με την μεμβράνη στο φλοιό, τις λάχνες και κατά μήκος του αυλακιού όσο προχωρά η κυτταροποίηση, διαμορφώνοντας πρότυπα συσσώρευσης παρόμοια με αυτά των νηματίων ακτίνης (Εικόνα 1.19). Επίσης, εντοπίζεται σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις στο κυτταρόπλασμα όσο φτάνουμε στο τέλος της κυτταροποίησης και κάτω από τη βάση των νεοσχηματισμένων κυττάρων πριν χαθεί τελείως κατά την γαστριδίωση. Αν και το πρωτεϊνικό προϊόν του γονιδίου *sry-a* σχετίζεται με τη μεμβράνη, καθώς εντοπίζεται σε ακραία τμήματα αλλά και εγκολπώσεις αυτής (apical and furrow membranes) πιθανότατα δεν αποτελεί παρεμβαλλόμενη στη μεμβράνη πρωτεΐνη (integral membrane protein).



Εικόνα 1.18: Ανάλυση Western blot της πρωτεΐνης του *sry-a*. Με χρήση *in vitro* μεταφρασμένων προϊόντων συνθετικού RNA του *sry-a* σε κύτταρα κουνελιού (a) και εμβρυικά εκχυλίσματα από έμβρυα που βρίσκονταν στο στάδιο του βλαστοδέρματος (b-e). Ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε με την τεχνική SDS-PAGE όπου σε κάθε πηγαδάκι φορτώθηκαν 10 µg πρωτεΐνης. Η 58-kD *sry-a* πρωτεΐνη ανιχνεύθηκε με αντίσωμα αντι-*sry-a*: a) στο κυτταρόπλασμα, b) σε ακατέργαστες μεμβράνες και c) σε κλάσματα. Οι άλλες ορατές ζώνες οφείλονται σε μη ειδική σύνδεση του δευτερογενούς αντισώματος όπως έδειξε η επώαση των ίδιων εκχυλισμάτων μόνο με το δευτερογενές αντίσωμα (d-e). Στα αριστερά φαίνεται ο δείκτης μοριακού βάρους σε kD (Schweisguth, Lepesant and Vincent, 1990)

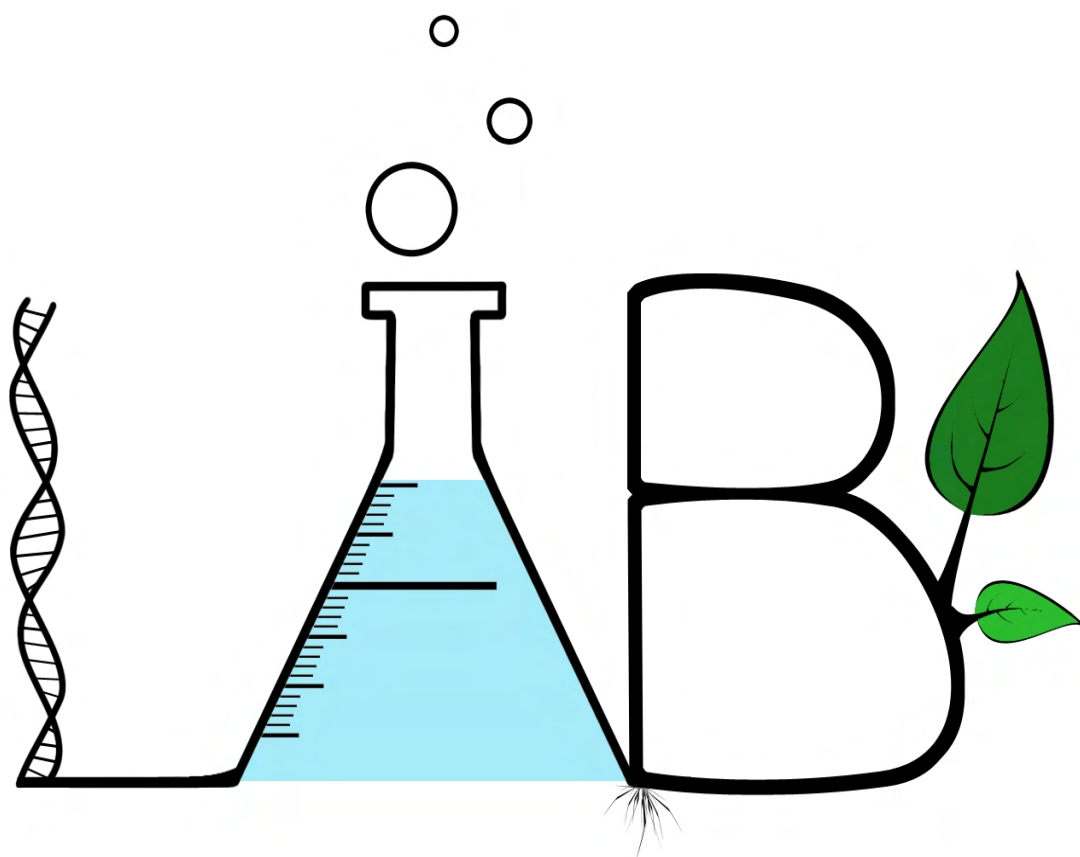
Η πρωτεΐνη του γονιδίου *sry-a* απαιτείται για την αρχική αναδιοργάνωση των κορυφαίων μικρονηματίων ακτίνης σε εξαγωνικές συστοιχίες, καθώς και για τη σταθεροποίηση τους κατά μήκος του καναλιού κατά την διάρκεια της εγκόλπωσης της μεμβράνης (Mazumdar et al., 2002). Έτσι μια απλή υπόθεση ήταν πως πιθανότατα η πρωτεΐνη συνδέεται στην ακτίνη (F-actin binding protein). Παρόλα αυτά, η πρωτεΐνη του *sry-a* δεν συγκαταλέγεται μεταξύ των 40 πρωτεϊνών που βρέθηκε πως προσδένονται στην ακτίνη και έχουν καθοριστεί με χρωματογραφία (Miller et al., 1989), ενώ ακόμα στερείται υποθετικών μοτίβων πρόσδεσης στην ακτίνη. Έτσι, ο ακριβής ρόλος του γονιδίου παραμένει ανεξακρίβωτος.

Απουσία του *sry-a* παρατηρούνται ελαττώματα στην κυτταροποίηση. Το *sry-a* είναι υπεύθυνο για τον εντοπισμό νηματίων ακτίνης πριν και κατά την διάρκεια του σχηματισμού των εγκολπώσεων της πλασματικής μεμβράνης, λειτουργία που το καθιστά απαραίτητο για τη κυτταροποίηση (Schweisguth, 1989). Επιπλέον, έχει βρεθεί πως σε στείρα μεταλλάγματα θηλυκών εντόμων, η ανάπτυξη του εμβρύου σταματά στη φάση της κυτταροποίησης (Schiirbach and Wieschaus, 1989), γεγονός που υποδηλώνει πως τα προϊόντα των γονιδίων που θα πρέπει να είναι διαθέσιμα για να γίνει η κυτταροποίηση βρίσκονται στο αυγό κατά την ωογένεση. Δηλαδή, πρωτεΐνες όπως η μυοσίνη, η ακτίνη, η τουμπουλίνη και η σπεκτρίνη βρίσκονται ήδη στο αυγό πριν την γονιμοποίηση (Karr and Alberts, 1986) και χαρακτηρίζονται ως μητρικής προέλευσης γονίδια. Ωστόσο, και το ζυγωτό συμβάλει στη διαδικασία με τουλάχιστον οκτώ γονιδιακούς τόπους, ένας εκ των οποίων είναι και ο γονιδιακός τόπος του *serendipity-a* (Merrill et al., 1988).

1.14 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μοριακή ανάλυση του γονιδίου *serendipity-alpha* (*sry-a*), το οποίο εκφράζεται στο στάδιο της κυτταροποίησης και είναι απαραίτητο για την ομαλή πρώιμη ανάπτυξη του δάκου της ελιάς, *Bactrocera oleae*. Η μελέτη του γονιδίου αυτού είναι καίριας σημασίας καθώς θα μπορούσε να συνεισφέρει σημαντικά στην ανάπτυξη κατάλληλων εργαλείων για τη γενετική διαχείριση του πληθυσμού του εντόμου. Για την επίτευξη αυτού του στόχου έγιναν προσπάθειες για την ταυτοποίηση του γονιδίου μέσω ενίσχυσης, κλωνοποίησης, διαλογής της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης και αλληλούχησης, ώστε να καθοριστεί η πλήρης αλληλουχία και η δομή του γονιδίου. Επιπρόσθετα, η προσέγγιση αυτή σε συνδυασμό με τα δεδομένα αλληλούχησης ολόκληρου του γονιδιώματος του εντόμου οδήγησαν στο εντοπισμό της αλληλουχίας του γονιδίου *sry-a*, στην ανάλυση της δομής και της οργάνωσης του. Τελικός στόχος της συγκεκριμένης μελέτης ήταν ο χαρακτηρισμός αλληλουχιών-μοτίβων και ο προσδιορισμός της αλληλουχίας του υποκινητή με ανάλυση *in silico*.

ΜΕΘΟΔΟΙ & ΥΛΙΚΑ



2.1 Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων

2.1.1 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από έντομα *B. oleae* (DNA extraction)

Η μέθοδος περιλαμβάνει την ομογενοποίηση των ιστών του εντόμου, τη λύση των κυττάρων, την κατακρήμνιση κυτταρικών υπολειμμάτων και πρωτεϊνών παρουσία αλάτων και τελικά την ανάκτηση του DNA μετά από κατακρήμνιση με ισοπροπανόλη.

Μεθοδολογία

Η μέθοδος πραγματοποιήθηκε με χρήση με του Wizard® Genomic DNA Purification kit (Promega).

1. Σε σωληνάκι τύπου erpendorf τοποθετείται ένα ενήλικο άτομο δάκου και με τη βοήθεια ειδικού εμβόλου (pestl), ομογενοποιείται σε 400 μl Διαλύματος Λύσης Πυρήνων (Nuclei Lysis Solution) που διατηρείται σε πάγο.
2. Το ομογενοποίημα επωάζεται στους 65°C για 25 λεπτά.
3. Το διάλυμα αφήνεται να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου, και έπειτα προστίθενται σε αυτό 135 μl Διαλύματος Κατακρήμνισης Πρωτεϊνών (Protein Precipitation Solution), μετά από ισχυρή ανάδευση ακολουθεί επώαση σε πάγο για 5 λεπτά.
4. Στη συνέχεια, το μείγμα φυγοκεντρείται σε 14,000 g για 5 λεπτά και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι erpendorf.
5. Προστίθενται 400 μl ισοπροπανόλης και μετά από ήπια ανάδευση, ακολουθεί φυγοκέντρωση σε 14,000 g για 5 λεπτά.
6. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα εκπλένεται με 500 μl παγωμένης αιθανόλης 70% και φυγοκεντρείται σε 14,000 g για 2 λεπτά.
7. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και ακολουθεί εξάτμιση του διαλύτη σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Το γονιδιωματικό DNA λαμβάνεται ως ίζημα, το οποίο επαναδιαλύεται σε 100 μl Διαλύματος Ενυδάτωσης DNA (DNA Rehydration solution) και επωάζεται στους 65°C για 1 ώρα.
9. Τα δείγματα γονιδιωματικού DNA διατηρούνται στους 4°C ή -20°C.

2.1.2 Απομόνωση φαγικού DNA από το βακτηριοφάγο λ (phage preps)

Μεθοδολογία

1. Αρχικά, βακτηριακά κύτταρα XL1-Blue MRA⁺ καλλιεργούνται σε υγρό θρεπτικό μέσο LB (5 ml) εμπλουτισμένο με 10 mM MgSO₄ και 0,2% μαλτόζη.
2. Ποσότητα (500 μl) της βακτηριακής καλλιέργειας αναμιγνύεται με τη διαχυμένη φαγική πλάκα (40 μl) σε σωληνάκι τύπου erpendorf και επωάζεται στους 37°C για 20 λεπτά.
3. Μέρος (300 μl) του μείγματος μεταφέρεται σε κωνική φιάλη όγκου 500 ml, η οποία περιέχει υγρό θρεπτικό μέσο LB (20 ml) εμπλουτισμένο με 10 mM MgSO₄.
4. Η καλλιέργεια επωάζεται στους 37°C έως ότου πραγματοποιηθεί η λύση των βακτηριακών κυττάρων (6–8 ώρες) και όταν αυτή επιτευχθεί προστίθεται χλωροφόρμιο (100 μl).
5. Η καλλιέργεια μεταφέρεται σε σωλήνα τύπου falcon όγκου 50 ml και φυγοκεντρείται σε 8,000 g για 10 λεπτά, ώστε να ιζηματοποιηθούν τα βακτηριακά υπολείμματα.
6. Το υπερκείμενο, το οποίο περιέχει τα φαγικά σωματίδια, μεταφέρεται σε νέο σωλήνα τύπου falcon όγκου 50 ml και επωάζεται με DNAάση και RNAάση σε συγκέντρωση 1

- μg/ml στους 37°C για 30 λεπτά, υπό ανάδευση.
7. Προστίθεται στερεό NaCl σε συγκέντρωση 1M, επωάζεται σε πάγο για τουλάχιστον 1-2 ώρες και ακολουθεί φυγοκέντρωση σε 11,000 g για 10 λεπτά στους 4°C.
 8. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα τύπου falcon όγκου 50 ml, προστίθεται PEG 8000 σε συγκέντρωση 10% w/v και επωάζεται στον πάγο για περίπου 2 ώρες.
 9. Ακολουθεί φυγοκέντρωση σε 11,000 g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C, ώστε να συλλεχθούν τα φαγικά σωματίδια.
 10. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και ο σωλήνας τύπου falcon αναστρέφεται για 2 δευτερόλεπτα προκειμένου να απομακρυνθούν και τα τελευταία υπολείμματα του υπερκείμενου.
 11. Το ίζημα αναδιαλύεται σε διάλυμα SM (1 ml), μεταφέρεται σε σωληνάκι τύπου erpendorf όγκου 2 ml και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου υπό ήπια ανάδευση για 30 λεπτά.
 12. Προστίθεται ίσος όγκος χλωροφορμίου (1 ml), ανακινείται ισχυρά και φυγοκεντρείται σε 3,000 g για 15 λεπτά, ώστε να απομακρυνθούν η πολυαιθυλενογλυκόλη και κυτταρικά υπολείμματα από το εναιώρημα των βακτηριοφάγων.
 13. Το αιώρημα των βακτηριοφάγων (υδατική φάση) μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι τύπου erpendorf.
 14. Έπειτα, προστίθεται EDTA σε τελική συγκέντρωση 20 mM, SDS σε τελική 0,5% και πρωτεΐνάση K σε τελική 50 μg/ml.
 15. Το διάλυμα επωάζεται στους 56°C για 1 ώρα, υπό ανάδευση.
 16. Αφού επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου εκχυλίζεται με φαινόλη/χλωροφόρμιο.
 17. Το φαγικό DNA κατακρημνίζεται με ισοπροπανόλη και το ίζημα αναδιαλύεται σε διάλυμα TE (200 μl), που περιέχει RNAάση σε συγκέντρωση 20 μg/ml.
 18. Τέλος, αποθηκεύεται στους 4°C.

Σημειώσεις:

- ✓ Η επώαση του εναιωρήματος με τις νουκλεάσες απαιτείται για την αποδόμηση των νουκλεϊκών οξέων που ελευθερώνονται κατά τη λύση των βακτηριακών κυττάρων, ώστε να αποφευχθεί η παγίδευση των φαγικών σωματιδίων σε αυτά.
- ✓ Η προσθήκη NaCl προάγει το διαχωρισμό των φαγικών σωματιδίων από τα βακτηριακά υπολείμματα.
- ✓ Η πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG8000) προκαλεί την κατακρήμνιση των φαγικών σωματιδίων.

2.2 Χειρισμός νουκλεϊκών οξέων

2.2.1 Εκχύλιση DNA με φαινόλη/χλωροφόρμιο

Η εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση πρωτεϊνών και κυτταρικών υπολειμμάτων από διαλύματα νουκλεϊκών οξέων. Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα της φαινόλης να αποδιατάσσει (μετουσιώνει) τις πρωτεΐνες και τις κυτταρικές μεμβράνες. Προκειμένου να προστατευτούν τα νουκλεϊκά οξέα από τα προϊόντα οξείδωσης της φαινόλης, συνιστάται η χρήση εξισορροπημένου διαλύτη. Η ταυτόχρονη προσθήκη του χλωροφορμίου οδηγεί στον σχηματισμό γαλακτωμάτων, αυξάνοντας την πυκνότητα της οργανικής (κάτω) φάσης. Μετά από φυγοκέντρωση, η υδατική (άνω) φάση περιέχει τα υδατοδιαλυτά νουκλεϊκά οξέα, ενώ οι πρωτεΐνες συγκεντρώνονται στη διεπιφάνεια μεταξύ των δύο φάσεων (μεσόφαση).

Μεθοδολογία

1. Σε υδατικό διάλυμα DNA προστίθεται ίσος όγκος φαινόλης/χλωροφορμίου (1:1).
2. Ακολουθεί έντονη ανάδευση και οι δύο φάσεις διαχωρίζονται με φυγοκέντρηση σε 14,000 g για 5 λεπτά.
3. Η υδατική φάση μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι errendorf, προστίθεται ίσος όγκος χλωροφορμίου και μετά από ήπια ανάδευση φυγοκεντρείται σε 14,000 g για 5 λεπτά.
4. Επανάληψη του σταδίου 3 για 3 φορές.
5. Ακολουθεί μεταφορά της υδατικής φάσης σε νέο σωληνάκι errendorf και ανάκτηση του DNA με κατακρήμνιση με αιθανόλη (υποενότητα 2.2.2).

2.2.2 Κατακρήμνιση νουκλεϊκών οξέων

Η μέθοδος επιτρέπει τη συμπύκνωση των νουκλεϊκών οξέων, με παράλληλη απομάκρυνση αλάτων και άλλων προσμίξεων από το διάλυμα. Η κατακρήμνιση νουκλεϊκών οξέων βασίζεται στη μείωση της διαλυτότητας των μορίων τους, η οποία εξασφαλίζεται σε συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας και υψηλής ιοντικής ισχύος με χρήση μονοσθενών κατιόντων και αιθανόλης. Η αιθανόλη λειτουργεί ως αφυδατικό μέσο του υδατικού περιβάλλοντος των νουκλεϊκών οξέων, με αποτέλεσμα να διευκολύνεται η δέσμευση των κατιόντων με τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες των νουκλεϊκών οξέων. Η εξουδετέρωση του ηλεκτρικού φορτίου του DNA μειώνει την υδατοδιαλυτότητα του, επιτρέποντας την καθίζησή του.

Μεθοδολογία

1. Σε υδατικό διάλυμα DNA όγκου V προστίθενται διπλάσιος όγκος (2V) παγωμένης αιθανόλης (100%) και οξικό νάτριο (CH_3COONa) σε τελική συγκέντρωση 0.3 M.
2. Το διάλυμα υφίσταται έντονη ανάδευση, επωάζεται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Το διάλυμα φυγοκεντρείται σε maximum rpm για 20 λεπτά.
4. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα εκπλένεται με μισό όγκο (0.5V) αιθανόλης 70%.
5. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε maximum rpm για 5 λεπτά (χωρίς vortex) και έπειτα απομακρύνεται το υπερκείμενο.
6. Το διάλυμα αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε επιθυμητό όγκο ddH₂O ή ρυθμιστικού διαλύματος TE.

Σημειώσεις:

- ✓ Για την αποτελεσματική κατακρήμνιση μικρής ποσότητας (έως 1 ml) νουκλεϊκών οξέων προστίθεται 0,5 μl γλυκογόνο (20 mg/ml) το οποίο παραμένει αδιάλυτο σε διάλυμα αιθανόλης, λειτουργώντας ως φορέας συγκατακρήμνιση.

2.2.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μορίων σε ένα πήκτωμα, που βρίσκεται κάτω από την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου. Μια από τις μεθόδους ηλεκτροφόρησης είναι η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης η οποία χρησιμοποιείται ευρέως στην ανάλυση των νουκλεϊκών οξέων. Η αγαρόζη είναι ένας πολυσακχαρίτης που απομονώνεται από κάποια είδη φυκών. Το πήκτωμα αγαρόζης παρασκευάζεται με διάλυση

κατάλληλης ποσότητας αγαρόζης (σε στερεή μορφή) σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα. Η στερεή αγαρόζη διαλύεται με βρασμό και στη συνέχεια στερεοποιείται αφού γίνει απόχυση σε ειδική φόρμα σχηματισμού (καλούπι) όπου στερεοποιείται και μετατρέπεται σε ένα πορώδες, ζελατινώδες πήκτωμα. Κατά την ηλεκτροφόρηση το πήκτωμα εμβαπτίζεται σε μια συσκευή η οποία περιέχει ένα ρυθμιστικό διάλυμα. Ακολουθώντας, τα δείγματα DNA φορτώνονται σε ειδικές εσοχές (πηγαδάκια) που έχουν δημιουργηθεί στο πήκτωμα, πριν αυτό στερεοποιηθεί, με την τοποθέτηση ενός κατάλληλου χτενιού. Μετά την φόρτωση των δειγμάτων, στο πήκτωμα εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο οπότε, καθώς το DNA είναι μόριο αρνητικά φορτισμένο, μεταναστεύει από τον θετικό πόλο προς τον αρνητικό πόλο. Μερικοί από τους παράγοντες που επηρεάζουν το ρυθμό μετανάστευσης είναι οι εξής:

- Το μέγεθος του DNA. Γραμμικά δίκλωνα DNA κινούνται με ρυθμό αντιστρόφως ανάλογο του λογάριθμου (log) του μοριακού τους βάρους.
- Η συγκέντρωση της αγαρόζης. Η κινητικότητα ενός κομματιού DNA διαφέρει σε πηκτώματα διαφορετικής συγκέντρωσης αγαρόζης. Χρησιμοποιώντας πηκτώματα διαφορετικών συγκεντρώσεων μπορούμε να διαχωρίσουμε ένα μεγάλο εύρος μεγεθών DNA.
- Τη στερεοδιάταξη του DNA. Η κλειστή (υπερελικωμένη) κυκλική μορφή (μορφή I), η ανοικτή κυκλική μορφή (μορφή II) και γραμμικό DNA (μορφή III) του ίδιου μοριακού βάρους έχουν διαφορετική κινητικότητα σε πηκτώματα αγαρόζης. Οι σχετικές κινητικότητες των τριών μορφών εξαρτώνται κυρίως από τη συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα, αλλά επηρεάζονται επίσης από την ένταση του ρεύματος, την ιονική ισχύ του ρυθμιστικού διαλύματος και το βαθμό υπερελίκωσης της μορφής I του DNA.
- Την ένταση του ρεύματος. Σε χαμηλή τάση (volts), που σημαίνει μικρό ρεύμα, η κινητικότητα γραμμικών κομματιών DNA είναι ανάλογη με τα volts που χρησιμοποιούνται. Όμως, αν αυξήσουμε την ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος (αύξηση των volts), η κινητικότητα κομματιών DNA μεγάλου μοριακού βάρους αυξάνονται με διαφορετικό συντελεστή για κάθε κομμάτι DNA.

Τα μικρότερα μόρια DNA μεταναστεύουν ταχύτερα ανάμεσα στους πόρους του πηκτώματος σε σύγκριση με τα μεγαλύτερα μόρια. Η συγκέντρωση της αγαρόζης που επιλέγεται για την ηλεκτροφόρηση, εξαρτάται από το μέγεθος των μορίων που πρόκειται να αναλυθούν. Πηκτώματα με χαμηλές συγκεντρώσεις αγαρόζης (0,4% -1,2% w/v) χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό μεγάλων μορίων DNA, ενώ πηκτώματα με υψηλές συγκεντρώσεις αγαρόζης (έως 2,5% w/v) είναι καταλληλότερα για την ανάλυση των μικρών μορίων DNA.

Μεθοδολογία

1. Η επιθυμητή ποσότητα αγαρόζης αναμειγνύεται με διάλυμα ηλεκτροφόρησης TAE ή TBE και θερμαίνεται έως ότου τηχθεί η αγαρόζη και το διάλυμα γίνει τελείως διαυγές (*παρατηρείται η ύπαρξη κάποιων φυσαλίδων*).
2. Προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 1 µg/ml.
3. Όταν η θερμοκρασία του διαλύματος της τηγμένης αγαρόζης κατεβεί στους 50°C, μεταφέρεται στο καλούπι πολυμερισμού ηλεκτροφορητικής συσκευής, στην οποία έχουν τοποθετηθεί, με κάθετη διευθέτηση «χτενάκια», ώστε να προκύψουν οι ειδικές θέσεις «πηγαδάκια» φόρτωσης των δειγμάτων.
4. Όταν στερεοποιηθεί το διάλυμα, τα χτενάκια απομακρύνονται, το πήκτωμα "ξεφορμάρεται" και τοποθετείται στην ηλεκτροφορητική συσκευή, η οποία περιέχει διάλυμα ηλεκτροφόρησης (*αντίστοιχο με αυτό που έχει χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή του πηκτώματος*), το οποίο πρέπει να "καλύπτει" το πήκτωμα.
5. Στα δείγματα προς ηλεκτροφόρηση προστίθεται διάλυμα χρωστικής με αναλογία

- (1:4).
6. Τα δείγματα φορτώνονται στα πηγαδάκια σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης υπό σταθερή τάση.
 7. Η παρακολούθηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιείται με έκθεση του πηκτώματος σε ακτινοβολία UV.

Σημειώσεις:

- ✓ Για τον προσδιορισμό του μεγέθους των ζωνών του DNA στο πήκτωμα παράλληλα με τα προς εξέταση δείγματα ηλεκτροφορείται το κατάλληλο πρότυπο μεγεθών DNA (ladder).
- ✓ Το διάλυμα χρωστικής αυξάνει την πυκνότητα του δείγματος λόγω της παρουσίας γλυκερόλης σε αυτό, ώστε να εισαχθεί ευκολότερα στο πηγαδάκι. Το διάλυμα είναι αρνητικά φορτισμένο και επομένως κινείται προς την ίδια κατεύθυνση με το DNA, επιτρέποντας τον έλεγχο της προόδου της ηλεκτροφόρησης.

Η ηλεκτροφόρηση μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τον ποσοτικό προσδιορισμό DNA. Ο ηλεκτροφορητικός ποσοτικός προσδιορισμός ενδείκνυται σε περιπτώσεις είτε χαμηλής συγκέντρωσης DNA, είτε μη καθαρότητας των προς ανάλυση διαλυμάτων. Η ένταση φθορισμού είναι ανάλογη της ποσότητας DNA. Έτσι, σύγκριση του φθορισμού που εκπέμπεται από το προς ανάλυση δείγμα με το φθορισμό γνωστής συγκέντρωσης και μήκους DNA (Ladder), παρέχει τη δυνατότητα εκτίμησης της ποσότητας του προς ανάλυση διαλύματος. Η εκτίμηση πραγματοποιείται είτε εμπειρικά, είτε με ποσοτική σύγκριση σε προγράμματα επεξεργασίας στον υπολογιστή.

2.2.4 Ανάκτηση από πήκτωμα αγαρόζης (gel extraction)

Η ανάκτηση από πήκτωμα αγαρόζης είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για την απομόνωση ενός επιθυμητού θραύσματος ακέραιου DNA από ένα πήκτωμα αγαρόζης μετά από ηλεκτροφόρηση. Τα δείγματα του DNA «τρέχουν» σε ένα πήκτωμα αγαρόζης και στη συνέχεια ακολουθεί η ανάκτηση, η οποία περιλαμβάνει τέσσερα βασικά βήματα: τον προσδιορισμό των θραυσμάτων που μας ενδιαφέρουν, την απομόνωση των αντίστοιχων ζωνών, την απομόνωση του DNA από αυτά τα κομμάτια και την αφαίρεση των συνοδευτικών αλάτων και προσμίξεων. Τέλος, υπάρχει η δυνατότητα ηλεκτροφόρησης μικρής ποσότητας του δείγματος για ποσοτικοποίηση.

Μεθολογία

1. Αρχικά, τοποθετούμε το πήκτωμα αγαρόζης σε UV ακτινοβολία ώστε να ανιχνεύσουμε τις ζώνες του DNA και με ένα νυστεράκι κόβουμε τη ζώνη που περιέχει το επιθυμητό θραύσμα DNA.
2. Το τμήμα του πηκτώματος που κόπηκε τοποθετείται σε ένα erppendorf και ζυγίζεται
3. Προστίθεται ίσος όγκος GB Buffer του kit στο erppendorf.
4. Το erppendorf τοποθετείται σε υδατόλουτρο για περίπου 7 λεπτά.
5. Το erppendorf αναδεύεται στο vortex και τοποθετείται στο υδατόλουτρο για επιπλέον 7 λεπτά.
6. Το erppendorf αναδεύεται ξανά στο vortex και αφού το τμήμα λιώσει μεταφέρεται όλο το περιεχόμενο του erppendorf στις ειδικές κολώνες του kit.
7. Περιμένουμε για 1 λεπτό και ακολουθεί φυγοκέντρωση τους στα 10,000g για 1 λεπτό.
8. Το έκλουσμα απομακρύνεται και προστίθενται 650 µl από το Wash Buffer που παρέχει το kit στην κολώνα και φυγοκέντρωση της στα 10,000 g για 1 λεπτό.
9. Το έκλουσμα απομακρύνεται και το πάνω μέρος της κολώνας μεταφέρεται σε νέο αποστειρωμένο erppendorf.

10. Ανάκτηση DNA σε 25-50 µl προθερμασμένου καθαρού νερού. Προσθήκη νερού, αναμονή για 2 λεπτά και στη συνέχεια φυγοκέντρωση στα 10,000 g για 1 λεπτό.
11. Το ανακτημένο στο eppendorf DNA (ως έκλουσμα) κάτω διατηρείται στους -20°C.

Σημειώσεις:

- ✓ Η έκθεση στην ακτινοβολία πρέπει να περιορίζεται στο ελάχιστο δυνατό για να αποτραπεί πιθανή μεταλλαξιογένεση του DNA.

2.2.5 Πέψη με ένζυμα περιορισμού

Ένζυμο περιορισμού ονομάζεται το ένζυμο, το οποίο υπάρχει φυσιολογικά σε βακτήρια και αρχαία και ο φυσιολογικός του ρόλος είναι η άμυνα του μικροοργανισμού απέναντι σε ιούς. Τέτοιου είδους ένζυμα αναγνωρίζουν συγκεκριμένες, μικρές σε μήκος αλληλουχίες νουκλεοτιδίων και πέπτουν σε μια θέση, η οποία ονομάζεται θέση περιορισμού, δημιουργώντας είτε συμπληρωματικά, είτε τυφλά άκρα. Απώτερος σκοπός της μεθόδου είναι η δημιουργία τμημάτων του DNA με το κατάλληλο μήκος προκειμένου να υπάρχει περαιτέρω επεξεργασία και ανάλυση.

Μεθοδολογία

1. Η κατάλληλη ποσότητα φαγικού (στη συγκεκριμένη περίπτωση) DNA, που έχει απομονωθεί, προστίθεται σε eppendorf 1,5 ml. Στο ίδιο eppendorf προστίθενται και τα υπόλοιπα υλικά της αντίδρασης σε συγκεντρώσεις, οι οποίες αναγράφονται στον πίνακα.

<u>Υλικά</u>	<u>Συγκέντρωση (C_f)</u>
DNA	100-500 ng
Buffer	1X
Ένζυμο περιορισμού	2 units
ddH ₂ O	συμπληρώνει τον όγκο
Τελικός όγκος (V _f)	30 µl
*f: final, η τελική συγκέντρωση στην αντίδραση	

2. Ακολουθεί επώαση της αντίδρασης για μία ώρα (ή overnight) στους 37°C, και στη συνέχεια τα προϊόντα των πέψεων ηλεκτροφορούνται.

Σημειώσεις:

- ✓ Η τεχνική της κατάτμησης ενός ανασυνδυασμένου πλασμιδίου DNA με χρήση των ενζύμων περιορισμού αποτελεί μια χρήσιμη διαδικασία, η οποία στοχεύει στην επιβεβαίωση ύπαρξης ενθέματος εντός του πλασμιδιακού φορέα. Οι θέσεις περιορισμού, στα πλασμίδια, βρίσκονται σε μια ειδική περιοχή που ονομάζεται πολυσυνδέτης.

2.2.6 Επεξεργασία με RNAase A

Η RNAase A (ριβονουκλεάση A) είναι μια ενδοριβονουκλεάση, η οποία "κόβει" μονόκλωνα μόρια RNA στο 3' άκρο ενός καταλοίπου πυριμιδίνης, δημιουργώντας ολιγονουκλεοτίδια, τα οποία καταλήγουν σε 3' -πυριμιδίνη- 3' φωσφορικό. Οι εφαρμογές της χρήσης του συγκεκριμένου ενζύμου είναι η απομάκρυνση του RNA από τα δείγματα DNA και η απομάκρυνση μη υβριδοποιημένων περιοχών RNA από υβρίδια DNA-RNA και RNA-RNA. Στη

συγκεκριμένη περίπτωση, η επεξεργασία με την RNAase A χρησιμοποιήθηκε για τον καθαρισμό των δειγμάτων φαγικού DNA από υπολείμματα μορίων RNA.

Μεθοολογία

1. Προσθήκη κατάλληλης ποσότητας από το ένζυμο RNAase A (εδώ χρησιμοποιήκαν 4 μ l) σε κάθε δείγμα.
2. Επώαση για 30 λεπτά στους 37°C.

2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) αποτελεί μια απλή, ταχεία, επιλεκτική και εξαιρετικά ευαίσθητη *in vitro* μέθοδο πολλαπλασιασμού του γενετικού υλικού ενός οργανισμού, η οποία πραγματοποιείται με την βοήθεια του ενζύμου της πολυμεράσης και επαναλαμβανόμενους κύκλους τριών διαδοχικών αντιδράσεων. Η PCR μέθοδος ενισχύει κομμάτια DNA μέχρι και 10 kb (Mullis et al., 1986).

Μία βασική αντίδραση PCR απαιτεί διάφορα συστατικά και αντιδραστήρια που περιλαμβάνουν:

- τη μήτρα DNA, η οποία περιέχει τη περιοχή DNA που θα ενισχυθεί.
- ένα ζεύγος εκκινητών, οι οποίοι είναι συμπληρωματικοί στο 3' άκρο της κάθε κωδικής και μη κωδικής αλυσίδας του DNA στόχου. Είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, συνήθως 15 – 30 βάσεων, τα οποία πρέπει να έχουν παρόμοια περιεκτικότητα σε G/C, να μην εμφανίζουν συμπληρωματικότητα στο 3' ή το 5' άκρο τους, να απέχουν μεταξύ τους κατά 50 ζεύγη βάσεων και να έχουν παραπλήσια θερμοκρασία τήξεως (T_m).
- ειδική DNA πολυμεράση (Taq πολυμεράση), που έχει απομονωθεί από το θερμοφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και είναι θερμοανθεκτική διατηρώντας τη *in vitro* ενζυμική της ενεργότητα σε θερμοκρασίες έως και 95°C, με βέλτιστη θερμοκρασία περίπου 75 – 80°C.
- κατάλληλο διάλυμα ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβοζονουκλεοτιδίων (dNTPs).
- ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) για την Taq πολυμεράση, ώστε να διατηρούνται σταθερά το pH και η ιονική ισχύς του περιβάλλοντος της αντίδρασης.
- κατάλληλη συγκέντρωση διαλύματος $MgCl_2$. Τα ιόντα Mg^{+2} σχηματίζουν διαλυτά σύμπλοκα με τα dNTPs ώστε να δημιουργήσουν το πραγματικό υπόστρωμα που αναγνωρίζει η πολυμεράση.

Κάθε κύκλος πολυμερισμού περιλαμβάνει τρία στάδια:

i.το στάδιο της αποδιάταξης του DNA. Η ολική αποδιάταξη του DNA στόχου πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 94°C για 20 – 30 δευτερόλεπτα. Η αποδιάταξη οφείλεται στη διάσπαση των δεσμών υδρογόνου ανάμεσα στις συμπληρωματικές αζωτούχες βάσεις.

ii.το στάδιο της αναδιάταξης των αλυσίδων με τους κατάλληλους συμπληρωματικούς εκκινητές. Η θερμοκρασία και ο χρόνος που χρειάζεται για την υβριδοποίηση των εκκινητών εξαρτάται από τη συγκέντρωσή τους στην αντίδραση, το μήκος και την αλληλουχία των βάσεων τους. Η θερμοκρασία της αντίδρασης για την υβριδοποίηση ρυθμίζεται περίπου 5°C χαμηλότερα από το σημείο τήξης (T_m).

iii.το στάδιο της επιμήκυνσης από κάθε εκκινήτη μιας συμπληρωματικής αλυσίδας. Ο χρόνος για την επιμήκυνση εξαρτάται από το μήκος και τη συγκέντρωση της αλληλουχίας στόχου και από τη θερμοκρασία της αντίδρασης. Συνήθως, πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 72°C.

<u>Υλικά</u>	<u>Συγκέντρωση (Ci)</u>
DNA	10-40 ng
Buffer	1X
dNTPs	0,8 mM
Εκκινήτης F	0,4-0,6 μM
Εκκινήτης R	0,4-0,6 μM
Taq πολυμεράση	1 unit
ddH ₂ O	συμπληρώνει τον όγκο
Τελικός όγκος (V _f)	20 μl

Σημείωση:

- ✓ Στην περίπτωση που ο συμπαράγοντας MgCl₂ δεν περιέχει στην Taq πολυμεράση προστίθεται έξτρα στην αντίδραση σε συγκέντρωση, η οποία εξαρτάται από την εκάστοτε πολυμεράση που χρησιμοποιείται στην αντίδραση PCR.
- ✓ Στη συγκεκριμένη περίπτωση επιλέχθηκαν 34 κύκλοι ενώ η θερμοκρασίες ήταν οι ακόλουθες:

95°C -> 3 min

95°C ->30sec
 51°C ->30 sec
 72°C ->30 sec

} 34 cycles

72°C ->4 min

2.4 Υβριδοποίηση

2.4.1 Σήμανση ανιχνευτών (Labeling probe)

Οι ανιχνευτές είναι μονόκλωνα μόρια τα οποία έχουν καθορισμένη αλληλουχία νουκλεοτιδίων και είναι σημασμένα ώστε να μπορούν να εντοπίζονται. Η σήμανση των διάφορων τύπων ανιχνευτών (DNA, RNA ανιχνευτών) πραγματοποιείται με την προσθήκη σημασμένων δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) ή ριβονουκλεοτιδίων (NTPs), εάν πρόκειται για DNA ή RNA ανιχνευτές αντίστοιχα. Τα βασικά στάδια της σήμανσης των ανιχνευτών περιλαμβάνουν την αρχική αποδιάταξη του δίκλωνου τμήματος και την επακόλουθη βαθμιαία αναδιάταξη κάθε αλυσίδας με τη βοήθεια τυχαίων εκκινήτων (random primers) και την πολυμεριστική δράση του ενζυμικού θραύσματος Klenow της DNA πολυμεράσης I. Η σήμανση των μορίων DNA γίνεται με τη συμπλήρωση των 3' υπολειμματικών άκρων του με βιοτυνιλιωμένο δεοξυνουκλεοτίδιο (Biotin-11-dUTP) και με εκκινήτες τυχαία δεκανουκλεοτίδια.

Μεθοδολογία

1. Το DNA (100 ng –1 µg), το οποίο πρόκειται να σημειωθεί, τοποθετείται σε σωληνάκι τύπου errendorf και προστίθενται το ρυθμιστικό διάλυμα της πολυμεράσης που περιέχει τυχαία δεκανουκλεοτίδια ως εκκινητές (1X) και η ποσότητα του ddH₂O που αντιστοιχεί σε αυτή που απαιτείται για να συμπληρωθεί ο τελικός όγκος της αντίδρασης (50 µl).
2. Το μείγμα αποδιατάσσεται με θέρμανση σε θερμοκρασία 100°C για 10 λεπτά και αμέσως τοποθετείται σε πάγο για 2 λεπτά.
3. Προστίθενται Biotin-11-dUTP (0,035 mM), μείγμα με σηματοδοτούμενων νουκλεοτιδίων (dGTP, dATP, dCTP, dTTP) και η DNA Klenow πολυμεράση (5U).
4. Το μείγμα αναδεύεται ήπια με πιπέτα και επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C για 12 – 16 ώρες.
5. Ακολουθεί κατακρήμνιση με ισοπροπανόλη και αναδιάλυση του ιζήματος σε ddH₂O (50 µl).

<u>Υλικά</u>	<u>Συγκέντρωση (Ci)</u>
DNA	100-500 ng
Buffer	1X
dNTPs	0,4 mM
Biotin-UTP	0,035 mM
Klenow	5 units
ddH ₂ O	Συμπληρώνει τον όγκο
Τελικός όγκος (V _f)	30 µl

Σημειώσεις:

- ✓ Για την επαλήθευση της σήμανσης των ανιχνευτών, πραγματοποιήθηκε, πριν τη χρήση τους, *spotting* (δοκιμή υβριδοποίησης ανιχνευτών, σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις, σε νάilon μεμβράνη, χωρίς DNA και εμφάνιση της μεμβράνης).

2.4.2 Μεταφορά DNA σε νάilon μεμβράνη

Με τον όρο μεταφορά εννοούμε την ακινητοποίηση των νουκλεϊκών οξέων, αφού προηγηθεί η αποδιάταξη τους ώστε να καταστούν μονόκλωνα, σε στερεό υπόστρωμα, το οποίο συνήθως είναι μεμβράνες. Τα ακινητοποιημένα νουκλεϊκά οξέα, στη συνέχεια, χρησιμοποιούνται ως «στόχοι» σε πειράματα υβριδοποίησης με τη χρήση των κατάλληλων κατά περίπτωση ανιχνευτών (Chomczynski, 1992).

Μεθοδολογία

1. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα αγαρόζης φωτογραφίζεται, αφού έχει τοποθετηθεί κατά μήκος του χάρακα, ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση του σήματος της μεμβράνης με τη φωτογραφία του πηκτώματος και κατά συνέπεια ο προσδιορισμός του τμήματος που υβριδοποιήθηκε.
2. Το πήκτωμα τοποθετείται σε ειδικό δοχείο
3. Το πήκτωμα επωάζεται σε διάλυμα αποδιάταξης σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανακίνηση για 15 λεπτά.
4. Το διάλυμα αποχύνεται και επαναλαμβάνεται το βήμα 3.
5. Το διάλυμα αποχύνεται και το πήκτωμα ξεπλένεται με απιονισμένο H₂O.

6. Προστίθεται διάλυμα εξουδετέρωσης και το πήκτωμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανακίνηση για 20 λεπτά.
7. Το διάλυμα αποχύνεται και επαναλαμβάνεται το βήμα 6.
8. Το διάλυμα αποχύνεται και το πήκτωμα ξεπλένεται με απιονισμένο H₂O.
9. Το πήκτωμα επωάζεται σε διάλυμα 6X SSC σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση για 5 λεπτά.
10. Η μεμβράνη με διαστάσεις λίγο μικρότερες από το πήκτωμα διαβρέχεται με απιονισμένο H₂O και στη συνέχεια με διάλυμα 6X SSC και τοποθετείται πάνω από το πήκτωμα χωρίς να δημιουργηθεί κενό μεταξύ πηκτώματος και μεμβράνης.
11. Δύο φύλλα διηθητικού χαρτιού Whatman διαβρέχονται με διάλυμα 6X SSC και τοποθετούνται πάνω στη μεμβράνη. Ακολουθούν ακόμη δύο φύλλα διηθητικού χαρτιού Whatman (στεγνά) και τέλος απορροφητικά χαρτιά, μικρότερων διαστάσεων της μεμβράνης κατά 10 mm. Στην κορυφή τοποθετείται βάρος περίπου 500 gr για να εξασφαλιστεί η επαφή μεταξύ πηκτώματος και μεμβράνης.
12. Η μεταφορά του DNA ολοκληρώνεται μετά από 2 ώρες, οπότε αφαιρούνται τα απορροφητικά χαρτιά και τα φύλλα Whatman και σημαδεύεται η μεμβράνη ώστε να είναι γνωστός ο προσανατολισμός της και η θέση των πηγαδιών.
13. Η μεμβράνη ξηραίνεται σε θερμοκρασία 80°C για 2 ώρες για να σταθεροποιηθεί το DNA και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου χρησιμοποιηθεί.

2.4.3 Μεταφορά φαγικών πλακών σε νάilon μεμβράνη

Η διαδικασία αποσκοπεί στη δημιουργία ενός αντιγράφου της επίστρωσης των βακτηριοφάγων.

Μεθοδολογία

1. Το τρυβλίο που θα χρησιμοποιηθεί για τη μεταφορά των πλακών σε μεμβράνη πρέπει να παραμείνει σε θερμοκρασία 4°C για τουλάχιστον 2 ώρες, ώστε να αποφευχθεί η μεταφορά τμημάτων της υπερκείμενης αгарόζης στη μεμβράνη.
2. Η μεμβράνη, με διαστάσεις σχεδόν όσο και το τρυβλίο, τοποθετείται στην επιφάνεια του τρυβλίου κατά τέτοιο τρόπο ώστε να διαβραχεί από το κέντρο προς την περιφέρεια και χωρίς να δημιουργηθεί κενό μεταξύ υπερκείμενης αгарόζης και μεμβράνης.
3. Όταν η μεμβράνη διαβραχεί πλήρως, προσανατολίζεται ως προς το τρυβλίο με τρυπήματα σε αντίστοιχα ασύμμετρα περιφερειακά σημεία της με αποστειρωμένη βελόνα ανατομίας.
4. Η μεμβράνη παραμένει πάνω στο τρυβλίο για 2 λεπτά και στη συνέχεια μεταφέρεται ανεστραμμένη, ώστε να μην έρθουν οι φάγοι σε άμεση επαφή, στην επιφάνεια διαλύματος αποδιάταξης για 2 λεπτά.
5. Ακολουθεί μεταφορά της μεμβράνης κατά τον ίδιο τρόπο σε διάλυμα εξουδετέρωσης για 5 λεπτά.
6. Η μεμβράνη ξεπλένεται σε διάλυμα Buffer για λιγότερο από 30 δευτερόλεπτα και αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά.
7. Τέλος, η μεμβράνη ξηραίνεται σε θερμοκρασία 80°C για 2 ώρες, ώστε να σταθεροποιηθεί η πρόσδεση του DNA και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου χρησιμοποιηθεί.

2.4.4 Υβριδοποίηση του ανιχνευτή σε μεμβράνη

Η διαδικασία υβριδοποίησης των νουκλεϊκών οξέων αποτελείται από τα στάδια της προϋβριδοποίησης και της υβριδοποίησης. Το στάδιο της προϋβριδοποίησης πραγματοποιείται για την μείωση του background με την κάλυψη των ελεύθερων θέσεων της μεμβράνης (θέσεις όπου δεν υπάρχει DNA), οι οποίες θα μπορούσαν να προκαλέσουν μη ειδική δέσμευση του ανιχνευτή. Κατά το στάδιο της υβριδοποίησης, επιτυγχάνεται ο σχηματισμός των υβριδίων μεταξύ των νουκλεοτιδικών αλυσίδων. Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε περιγράφεται από τους Church and Gilbert (1984).

Μεθοδολογία

1. Η μεμβράνη τοποθετείται σε ειδικό σωλήνα υβριδοποίησης, ο οποίος περιέχει ποσότητα διαλύματος υβριδοποίησης ανάλογα με το εμβαδό της (εμβαδό x 0,2 = ml διαλύματος υβριδοποίησης).
2. Στη συνέχεια, προστίθεται DNA από σπέρμα σολομού (ssDNA) σε συγκέντρωση 100 µg/ml διαλύματος υβριδοποίησης, το οποίο προηγουμένως έχει θερμανθεί σε 100°C για 10 λεπτά ώστε να αποδιαταχθεί και έχει τοποθετηθεί για 2 λεπτά στον πάγο.
3. Ο σωλήνας τοποθετείται σε θάλαμο υβριδοποίησης και επωάζεται περιστρεφόμενος για 2 ώρες στη θερμοκρασία υβριδοποίησης του ανιχνευτή, δηλαδή στους 60°C.
4. Το διάλυμα υβριδοποίησης αποχύνεται και προστίθεται νέο διάλυμα υβριδοποίησης και ο ανιχνευτής (100–200 ng/ml διαλύματος), ο οποίος έχει πρώτα θερμανθεί σε 100°C για 10 λεπτά ώστε να αποδιαταχθεί και στη συνέχεια, έχει τοποθετηθεί για 2 λεπτά στον πάγο.
5. Ο σωλήνας μεταφέρεται σε θάλαμο υβριδοποίησης και η υβριδοποίηση πραγματοποιείται για 14–16 ώρες στην ίδια θερμοκρασία με την προϋβριδοποίηση, δηλαδή στους 60°C.

2.4.5 Εμφάνιση σήματος

Η διαδικασία βασίζεται αρχικά στην απομάκρυνση της περίσσειας του ανιχνευτή από τη μεμβράνη (πλύσεις) και στη συνέχεια στην εμφάνιση του σήματος λόγω της ικανότητας ισχυρής σύνδεσης της στρεπταβιδίνης με τη βιοτίνη.

Μεθοδολογία

1. Το διάλυμα υβριδοποίησης που περιέχει τον ανιχνευτή συλλέγεται σε σωλήνα τύπου falcon και διατηρείται σε θερμοκρασία -20°C, έως ότου επαναχρησιμοποιηθεί.
2. Η μεμβράνη τοποθετείται σε ειδικό δοχείο, το οποίο περιέχει διάλυμα πλύσης 1 και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση, για 5 λεπτά.
3. Το διάλυμα απορρίπτεται και επαναλαμβάνεται το βήμα 2.
4. Ακολουθεί επώαση σε διάλυμα πλύσης 2 υπό ανάδευση στη θερμοκρασία όπου πραγματοποιήθηκε η υβριδοποίηση (60°C) για 20 λεπτά.
5. Το διάλυμα απορρίπτεται και επαναλαμβάνεται το βήμα 4.
6. Η μεμβράνη εξισορροπείται σε διάλυμα A για 1 λεπτό και στη συνέχεια επωάζεται σε διάλυμα B για τουλάχιστον 30 λεπτά, υπό ανάδευση.
7. Το διάλυμα B απορρίπτεται και προστίθεται διάλυμα B, το οποίο περιέχει 5 µl συμπλόκου στρεπταβιδίνης – αλκαλικής φωσφατάσης ανά 10 ml, και επωάζεται για 30 λεπτά υπό ανάδευση.
8. Η μεμβράνη ξεπλένεται με διάλυμα A για 15 λεπτά, υπό κίνηση, και επαναλαμβάνεται

- το βήμα.
9. Η μεμβράνη εξισορροπείται σε διάλυμα C για 2 λεπτά.
 10. Η ανίχνευση του σήματος πραγματοποιείται με κάλυψη της μεμβράνης με διάλυμα C το οποίο περιέχει 50 μl NBT και 37,5 μl BCIP ανά 10 ml διαλύματος.
 11. Η εμφάνιση διακόπτεται με πολλαπλές πλύσεις της μεμβράνης με απιονισμένο H₂O.

Σημειώσεις:

- ✓ Το SSC στο διάλυμα πλύσης 2 βρίσκεται σε μικρότερη συγκέντρωση σε σύγκριση με το διάλυμα πλύσης 1, διότι όσο πιο αραιή η συγκέντρωση τόσο πιο πολύ μειώνεται η ιοντική ισχύς. Όσο μειώνεται η ιοντική ισχύς τόσο πιο εύκολα αποσυνδέονται τα μόρια.

2.5 Κλωνοποίηση

Με τον όρο κλωνοποίηση ονομάζουμε τη διαδικασία δημιουργίας ενός ή περισσότερων ακριβών αντιγράφων από ένα πρότυπο. Αυτό το πρότυπο μπορεί να αντιπροσωπεύει ένα μόριο (π.χ. DNA ή RNA) ή ένα γονίδιο, ένα κύτταρο (π.χ. βακτήριο), ή ακόμη και έναν πολυκύτταρο οργανισμό. Η κλωνοποίηση αποτελείται από τη διαδικασία της σύνδεσης (ligation) και τη διαδικασία της ηλεκτροδιάτρησης (electroporation).

2.5.1 Αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA σε πλασμιδιακό φορέα (ligation)

Η διαδικασία έχει ως στόχο την κατασκευή ενός ανασυνδυασμένου πλασμιδίου, μέσω της εισαγωγής ενός ενθέματος στην αλληλουχία του. Για τον ανασυνδυασμό, το πλασμίδιο θα πρέπει να βρίσκεται σε γραμμική μορφή έτσι ώστε να συνδεθεί στο ένα του άκρο το ένθεμα, μέσω της δράσης του ενζύμου DNA λιγάση, και στη συνέχεια να επανακυκλοποιηθεί.

Μεθοδολογία

1. Αρχικά, υπολογίζεται η ποσότητα του ενθέματος που θα εισαχθεί στην αντίδραση σύνδεσης με τον πλασμιδιακό φορέα. Η ποσότητα αυτή υπολογίζεται από τον τύπο:

$$ng\ DNA = ng\ πλασμιδίου \times \frac{\text{μέγεθος DNA}}{\text{μέγεθος φορέα}} \times \text{μοριακός λόγος}$$

Ο μοριακός λόγος συνήθως είναι 5:1, έτσι ώστε μέσα στην αντίδραση να υπάρχει περίσσεια τμημάτων DNA και έτσι να αυξηθούν οι πιθανότητες δημιουργίας ανασυνδυασμένων πλασμιδίων.

2. Μέσα σε σωλήνα erppendorf 1,5 ml προστίθενται οι σωστές ποσότητες των υλικών όπως φαίνεται στον πίνακα.
3. Μετά την εισαγωγή των υλικών, το erppendorf επωάζεται στους 22°C για 60 λεπτά σε μια απλή συσκευή PCR. Μετά το πέρας της επώασης, το erppendorf διατηρείται στους 4°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί στα επόμενα στάδια της κλωνοποίησης.

<u>Υλικά</u>	<u>Συγκεντρώσεις (C_f)</u>
DNA ενθέματος	υπολογίζεται από τον τύπο
DNA φορέα	1 µL (50ng)
DNA λιγάση	0,3 µL (1,5 U)
Buffer	1µL (1X)
ddH ₂ O	συμπληρώνει τον όγκο της αντίδρασης
Τελικός όγκος(V _f)	10 µL

2.5.2 Παρασκευή δεκτικών κυττάρων για ηλεκτροδιάτρηση

Το πρωτόκολλο αυτό χρησιμοποιείται με σκοπό τα κύτταρα, τα οποία πρόκειται να υποστούν ηλεκτροδιάτρηση να υποστούν την κατάλληλη επεξεργασία πριν χρησιμοποιηθούν, έτσι ώστε να καταστούν διαπερατά σε πλασμίδια μετά την έκθεσή τους στο ηλεκτρικό πεδίο.

Μεθοδολογία

1. Ενοφθάμιση ποσότητας κυττάρων DH5α, που διατηρούνται στους -80°C με χρήση αποστειρωμένου μικροβιολογικού κρίκου, σε αποστειρωμένο στερεό θρεπτικό υλικό LB άγαρ (striking).
2. Επώαση καλλιέργειας για 16 ώρες στους 37°C.
3. Προσθήκη σε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα 1 ml αποστειρωμένου υγρού θρεπτικού υλικού LB Broth, υπό στείρες συνθήκες.
4. Απομόνωση μιας αποικίας από την στερεή καλλιέργεια DH5α με τη βοήθεια οδοντογλυφίδας και εισαγωγή της σε αποστειρωμένο υγρό θρεπτικό μέσο LB Broth.
5. Επώαση του ενοφθαλισμένου υγρού θρεπτικού για 16 ώρες, στους 37°C, υπό ανάδευση (210rpm).
6. Ακολουθεί μεταφορά της βακτηριακής καλλιέργειας σε αποστειρωμένη κωνική φιάλη με υγρό LB Broth (300 mL) και επώαση στους 37°C, υπό ανάδευση (210 rpm) έως ότου η τιμή της οπτικής πυκνότητας OD₆₀₀ του εναιωρήματος να κυμαίνεται μεταξύ 0,4-0,6 (περίπου 2 ώρες).
7. Μεταφορά της καλλιέργειας σε σωλήνα falcon των 50 mL και διατήρησή της στον πάγο για περίπου 10 λεπτά, με στόχο την αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων.
8. Στη συνέχεια γίνεται συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντρηση στα 4,000 g, για 10 λεπτά στους 4°C.
9. Το υπερκείμενο αποχύνεται και το ίζημα επαναδιαλύεται ήπια σε προψυγμένο απιονισμένο νερό (~50 ml/falcon).
10. Το εναιώρημα φυγοκεντρείται στα 4,000 g, για 10 λεπτά στους 4°C.
11. Επανάληψη των βημάτων 9 και 10.
12. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα κύτταρα επαναδιαλύονται ήπια σε προψυγμένο διάλυμα γλυκερόλης 10% (4 ml/falcon) και φυγοκεντρούνται στα 4,000 g, για 10 λεπτά στους 4°C.
13. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και ήπια επαναδιάλυση του ιζήματος σε προψυγμένο διάλυμα γλυκερόλης 10% (250µl/falcon).
14. Το κυτταρικό εναιώρημα διαιρείται σε κλάσματα των 40 µL σε προψυγμένα σωληνάκια erppendorf (~ 8 erppendorf/falcon).
15. Τέλος, τα κλάσματα διατηρούνται στους -80°C.

2.5.3 Μετασχηματισμός κυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση

Η ηλεκτροδιάτρηση είναι μια μηχανική μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως στη μοριακή βιολογία για την εισαγωγή DNA σε δεκτικά κύτταρα, μέσω παροδικών πόρων που δημιουργούνται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη με τη βοήθεια ηλεκτρικού παλμού. Οι ηλεκτρικοί παλμοί αποδιοργανώνουν στιγμιαία τη φωσφολιπιδική διπλοστοιβάδα της μεμβράνης, προκαλώντας το σχηματισμό παροδικών οπών, επιτρέποντας έτσι στο DNA να εισέλθει στο εσωτερικό του κυττάρου (Neuman et al, 1982).

Μεθοδολογία

1. Τα κλάσματα των δεκτικών κυττάρων DH5α που έχουν υποστεί επεξεργασία για ηλεκτροδιάτρηση (40 μ L) τοποθετούνται από τους -80°C στον πάγο, για να τηχθούν.
2. Ακολουθεί αραιώση 1:10 του δείγματος των ανασυνδυσασμένων πλασμιδίων και προσθήκη 2 μ L από την αραιώση στα κύτταρα.
3. Επώαση στον πάγο για 1 λεπτό.
4. Μεταφορά του μίγματος σε ειδική προψυγμένη κυψελίδα, διαμέτρου 0,2cm και τοποθέτηση της στη θέση υποδοχής της συσκευής.
5. Εφαρμογή ηλεκτρικού παλμού εντάσεως 13,8 kV/cm
6. Ακολουθεί άμεση προσθήκη 1 ml διαλύματος θρεπτικού SOC (εντός ενός λεπτού).
7. Ανάδευση και μεταφορά όλης της ποσότητας σε αποστειρωμένο σωλήνα.
8. Τέλος, γίνεται επώαση του μίγματος, υπό ήπια ανάδευση (180 rpm) σε θερμοκρασία 37°C για 1 ώρα.

Σημειώσεις:

- ✓ Χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή στη διάρκεια εφαρμογής και στην ένταση του διαχεόμενου ρεύματος, καθώς υψηλότερες τιμές μπορεί να δημιουργήσουν πόρους που θα προκαλέσουν λύση του κυττάρου, εξαιτίας του ωσμωτικού φαινομένου.

2.5.4 Καλλιέργεια μετασχηματισμένων κυττάρων και διάκριση ανασυνδυσασμένων κλώνων

Η διαδικασία αυτή ξεκινά με την επίστρωση των κυττάρων, μετά την ηλεκτροδιάτρηση, σε ειδικό μέσο που περιέχει ένα δείκτη επιλογής και ένα δείκτη αναφοράς για τον διαχωρισμό των ανασυνδυσασμένων κλώνων από τους μη ανασυνδυσασμένους. Ως δείκτης επιλογής χρησιμοποιείται το αντιβιοτικό αμικικιλίνη, ώστε να αναπτυχθούν μόνο τα κύτταρα που φέρουν το πλασμίδιο, το οποίο περιέχει το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμικικιλίνη και άρα έχουν ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό.

Η ταυτοποίηση των βακτηρίων που φέρουν το ανασυνδυσασμένο πλασμίδιο πραγματοποιείται με τον έλεγχο της α-συμπληρωματικότητας του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση. Οι απαραίτητες αλληλουχίες για την κωδικοποίηση του ενζύμου βρίσκονται στο γονιδίωμα της *E. coli* και στο πλασμιδιακό DNA. Φυσιολογικά η από κοινού έκφραση των αλληλουχιών του πλασμιδιακού φορέα και του βακτηρίου οδηγούν στη σύνθεση της β-γαλακτοσιδάσης. Σε περίπτωση ανασυνδυασμού, η αλληλουχία του ενθέματος εισάγεται στην περιοχή του πολυσυνδέτη του πλασμιδίου, διακόπτοντας το αναγνωστικό πλαίσιο του γονιδίου *lacZ* και άρα διακόπτοντας τη σύνθεση β-γαλακτοσιδάσης. Η σύνθεση ή μη του ενζύμου ελέγχεται μέσω της εισαγωγής στο υπόστρωμα του χρωμογόνου υποστρώματος X-gal, το οποίο φυσιολογικά μεταβολίζεται από τη β-γαλακτοσιδάση δημιουργώντας χαρακτηριστικές μπλε αποικίες, παρουσία του επαγωγέα IPTG. Οπότε, εάν ο ανασυνδυασμός του πλασμιδίου είναι

επιτυχής, τότε το X-gal δε θα μεταβολίζεται και άρα οι αποικίες θα διακρίνονται με λευκό (άχρωμο) χρώμα. Αντίθετα, σε περίπτωση που ο ανασυνδυασμός αποτύχει οι βακτηριακές αποικίες θα εμφανίζονται μπλε.

Μεθοδολογία

1. Αρχικά, παρασκευάζεται και αποστειρώνεται η επιθυμητή ποσότητα στερεού θρεπτικού LB άγαρ (25-30 mL/ανά τρυβλίο), στο οποίο προστίθεται η αντίστοιχη ποσότητα αμπικιλίνης (100 µg/mL).
2. Τοποθέτηση του LB άγαρ στα τρυβλία, υπό στείρες συνθήκες, για τη στερεοποίηση του.
3. Προσθήκη 30µl X-gal, 3 µl IPTG καθώς και της επιθυμητής ποσότητας μετασχηματισμένων κυττάρων και επίστρωσή τους στα τρυβλία.
4. Επώαση των τρυβλίων ανεστραμμένων στους 37°C για 12-16 ώρες.
5. Ταυτοποίηση των ανασυνδυασμένων αποικιών, βάσει του χρώματός τους (λευκές).

2.6 Βακτηριοφάγος λ-DASH® II– Γονιδιωµατική βιβλιοθήκη

Οι γονιδιωµατικές βιβλιοθήκες, περιέχουν όλο το γονιδίωμα ενός οργανισµού ενσωµατωµένο σε τυχαία κοµµάτια μεγέθους της τάξεως των 15 kb μέσα σε φάγους. Οι τελευταίοι αποτελούν εναλλακτικούς φορείς κλωνοποίησης, κατά τον χειρισµό μεγάλων τµηµάτων γονιδιωµατικού DNA. Το κάθε φαγικό σωµάτιο διαθέτει και ένα διαφορετικό τµήµα του γονιδιώµατος. Ο βακτηριοφάγος lambda-DASH®II (Stratagene) είναι ο φορέας αντικατάστασης (Lagos et al., 2005), για την κατασκευή της γονιδιωµατικής βιβλιοθήκης του δάκου. Οι βιβλιοθήκες χρησιµεύουν στον εντοπισµό και την επιλογή συγκεκριµένων τµηµάτων DNA (όπως ολόκληρα γονίδια µε τις γειτονικές τους περιοχές), καθώς και σε µελέτες χαρτογράφησης. Ο βακτηριοφάγος λ-DASH® II αποτελεί φορέα αντικατάστασης ο οποίος χρησιµοποιείται για την κλωνοποίηση μεγάλων τµηµάτων γονιδιωµατικού DNA και παρουσιάζει τα εξής χαρακτηριστικά:

- αναπτύσσεται σε κύτταρα XL1-Blue MRA' (P2) εκµεταλλευόµενος την επιλογή *spⁱ* (*spⁱ* selection-sensitive to P2 inhibition). Οι βακτηριοφάγοι λ, οι οποίοι περιέχουν ενεργά τα γονίδια *red* και *gam* δεν µπορούν να αναπτυχθούν σε στελέχη ξενιστών που περιέχουν λυσιγόνους φάγους P2. Τα γονίδια *red* και *gam* στο βακτηριοφάγο λ-DASH® II εντοπίζονται στο τµήµα που αποµακρύνεται κατά την εισαγωγή του ενθέµατος (*stuffer*). Έτσι, ο αγρίου τύπου λ-DASH® II δεν µπορεί να αναπτυχθεί σε κύτταρα XL1-Blue MRA', σε αντίθεση µε τον ανασυνδυασµένο λ-DASH® II, ο οποίος καθίσταται *red-/gam-* µετά την αποµάκρυνση του «*stuffer*» και την εισαγωγή του ενθέµατος. Με τον τρόπο αυτό, κατά την επίστρωση της βιβλιοθήκης σε στέλεχος XL1-Blue MRA' (P2) πραγµατοποιείται *spⁱ* επιλογή και αναπτύσσονται µόνο ανασυνδυασµένοι βακτηριοφάγοι.
- είναι κατασκευασµένος κατά τέτοιο τρόπο ώστε να φέρει εκατέρωθεν του ενθέµατος, τους υποκινητές T3 και T7 και να επιτρέπει τη δηµιουργία τελο-ειδικών (*end-specific*) RNA ανιχνευτών και το ένθεµα µπορεί να αποµακρυνθεί µε κατάτµηση µε την περιοριστική ενδονουκλεάση *NotI*, καθώς αυτό είναι κλωνοποιηµένο στις θέσεις *EcoRI* του φορέα.

2.6.1 Προετοιμασία βακτηρίων-ξενιστών του βακτηριοφάγου lambda

Τα βακτήρια εισέρχονται μέσα στα κύτταρα συνδεδεμένα με τον εξωμεμβρανικό υποδοχέα μαλτοπορίνης. Ο φυσιολογικός ρόλος του συγκεκριμένου υποδοχέα είναι η διευκόλυνση της διάχυσης της μαλτόζης μέσα στα κύτταρα και η σύνδεσή του στη μεμβράνη του κυττάρου επάγεται από την ίδια τη μαλτόζη και καταστέλλεται από τη γλυκόζη. Τα κύτταρα- ξενιστές λοιπόν, αναπτύσσονται σε μέσο που περιέχει μαλτόζη και μαγνήσιο, ώστε να επαχθεί η μεταφορά των υποδοχέων στη μεμβράνη και να διευκολυνθεί η πρόσδεση του φάγου στον υποδοχέα αντίστοιχα.

Μεθοδολογία

1. Σε υγρό θρεπτικό μέσο καλλιέργειας LB Broth εμπλουτισμένο με 10 mM $MgSO_4$ και 0,2% μαλτόζη, ενοφθαλμίζονται βακτηριακά κύτταρα XL1-Blue MRA' και επωάζονται για 4-6 ώρες στους 37°C υπό ισχυρή ανάδευση (220 rpm) ή για 12-16 ώρες στους 30°C.
2. Φυγοκέντρωση στα 4.000 g για 10 λεπτά.
3. Απόρριψη του υπερκείμενου και συλλογή των κυττάρων που καθιζάνουν.
4. Ήπια επαναδιάλυση του ιζήματος στην απαιτούμενη ποσότητα διαλύματος $MgSO_4$ 10 mM ώστε η οπτική πυκνότητα OD600 του κυτταρικού εναιωρήματος να κυμαίνεται μεταξύ 0,4 και 0,6.
5. Διατήρηση των κυττάρων στους 4°C.

2.6.2 Επίστρωση γονιδιωματικής βιβλιοθήκης σε τρυβλίο

Η γονιδιωματική βιβλιοθήκη παρέχει τη δυνατότητα επιλογής συγκεκριμένων κλώνων μέσω υβριδοποίησης με τους κατάλληλους ανιχνευτές. Ο συνολικός αριθμός των ανασυνδυασμένων βακτηριοφάγων (N) που απαιτείται να σαρωθεί για να επιτευχθεί απομόνωση ενός κλώνου με πιθανότητα (P) 99% σε μια βιβλιοθήκη εξαρτάται από το μέσο μέγεθος των ενθεμάτων και από το μέγεθος του ως προς διαλογή γονιδιώματος σύμφωνα με τον τύπο:

$$N = (\ln(1-P)) / (\ln(1-f))$$

Όπου f είναι το κλάσμα του ενθέματος προς το γονιδίωμα.

Μεθοδολογία

1. Ανάμιξη της επιθυμητής ποσότητας ανασυνδυασμένων βακτηριοφάγων με βακτήρια ξενιστές XL1-Blue MRA' σε σωλήνα eppendorf.
2. Επώαση στους 37°C για 20 λεπτά.
3. Μεταφορά των μειγμάτων σε σωλήνες falcon των 50 ml, που περιέχουν 30 ml υπερκείμενης αγαρόζης NZY και διατήρησή τους στους 49°C.
4. Ακολουθεί ανάδευση και μεταφορά σε προθερμανσμένο στους 37°C τρυβλίο με NZY-άγαρ διαστάσεων 22cm x 22cm.
5. Ανακίνηση τρυβλίου για ομοιόμορφη κατανομή του μείγματος.
6. Μετά τη στερεοποίηση της υπερκείμενης αγαρόζης ακολουθεί επώαση των τρυβλίων στους 37°C για 12 ώρες.

2.6.3 Συλλογή πλάκας βακτηριοφάγου λ

Μια πλάκα περιέχει περίπου 10^6 - 10^7 φαγικά σωμάτια, τα οποία μπορούν να διατηρηθούν σε διάλυμα SM/χλωροφορμίου στους 4°C για μεγάλο χρονικό διάστημα χωρίς να χάσουν τη βιωσιμότητά τους. Δεδομένου ότι οι βακτηριοφάγοι διαχέονται σε μεγάλες αποστάσεις, συνίσταται η επιλογή απομονωμένων πλακών καθώς και η σύντομη απομόνωση τους μετά την εμφάνισή τους.

Μεθοδολογία

Με τη χρήση γυάλινης πιπέτας Pasteur απομονώνεται η επιθυμητή βακτηριοφαγική πλάκα μαζί με το άγαρ και την υπερκείμενη αгарόζη και τοποθετείται σε 200 μl διάλυμα SM, το οποίο περιέχει χλωροφόρμιο (0,3%), προκειμένου να παρεμποδίζεται η ανάπτυξη μικροοργανισμών. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C για 12 ώρες, ώστε να επιτευχθεί η διάχυση των φαγικών σωματίων στο διάλυμα.

2.6.4 Διαλογή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης

Η διαλογή της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης επιτρέπει την απομόνωση επιθυμητών αλληλουχιών. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη μεταφορά σε μεμβράνη των φαγικών πλακών, οι οποίες έχουν δημιουργηθεί στο στερεό υπόστρωμα και τον εντοπισμό στη συνέχεια των επιθυμητών πλακών με χρήση ενός κατάλληλα σημασμένου ανιχνευτή.

Στη περίπτωση που δεν είναι εφικτή η απομόνωση μεμονωμένης πλάκας, η διαλογή της βιβλιοθήκης πραγματοποιείται σε δύο φάσεις. Στην πρωτογενή διαλογή (primary screening) απομονώνονται πλάκες, με την πλευρά της πιπέτας με τη μεγάλη διάμετρο και έπειτα επωάζονται για 12-16 ώρες σε SM διάλυμα. Στη συνέχεια, επιστρώνονται σε τρυβλία, όπου και γίνεται η δευτερογενής διαλογή (secondary screening). Η δευτερογενής διαλογή γίνεται με την πλευρά της πιπέτας με τη μικρή διάμετρο και έχει ως στόχο την απομόνωση της μεμονωμένης πλάκας που δίνει σήμα.

Μεθοδολογία

Τα στάδια της τεχνικής είναι τα ίδια με την ανάλυση κατά Southern, όσον αφορά την υβριδοποίηση και την ανίχνευση του σήματος, με μόνη διαφορά τη διαδικασία μεταφοράς σε μεμβράνη, η οποία παρουσιάζεται στην υποενότητα 2.4.3.

2.7 *In silico* ανάλυση νουκλεοτιδικών και πρωτεϊνικών αλληλουχιών

2.7.1 Αναζήτηση πληροφορίας σε βιολογικές Βάσεις Δεδομένων (ΒΔ)

Μια βάση δεδομένων (ΒΔ) χρησιμοποιείται για την οργάνωση, αποθήκευση, επεξεργασία, αναζήτηση και ανάκτηση της βιολογικής πληροφορίας. Οι τύποι δεδομένων που συναντώνται στις ΒΔ είναι:

- νουκλεοτιδικές ακολουθίες (DNA, RNA) και γονιδιώματα
- ακολουθίες πρωτεϊνών
- 3-D δομές πρωτεϊνών και νουκλεϊνικών οξέων
- δεδομένα γονιδιακής έκφρασης

- δεδομένα γενετικής ποικιλότητας (πολυμορφισμοί)

Πολλές από τις ΒΔ, αν και χρησιμοποιούν σχεσιακά ή αντικειμενοστρεφή συστήματα διαχείρισης, παρέχουν όλη τη διαθέσιμη πληροφορία για μια εγγραφή σε ένα μεγάλο δομημένο αρχείο κειμένου. Πληροφορίες σχετικά με τις διαθέσιμες ΒΔ καθώς και εργαλεία λογισμικού μπορούν να αναζητηθούν σε εξειδικευμένα επιστημονικά περιοδικά ή ιστότοπους, όπως:

- Nucleic Acids Research Database Issue and the online Molecular Biology Database Collection (<http://nar.oxfordjournals.org/>)
- Database: The Journal of Biological Databases and Curation (<http://database.oxfordjournals.org/>)
- NCBI Resource Guide (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/all/>)

2.7.2 Αναζήτηση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών

Οι ΒΔ νουκλεοτιδικών ακολουθιών καθιστούν ελεύθερα διαθέσιμα στην επιστημονική κοινότητα ετερογενή στοιχεία που ποικίλλουν όσον αφορά στην προέλευση του υλικού (π.χ. γονιδίωμα έναντι cDNA), στην ποιότητα του, στην έκταση του σχολιασμού και στην πληρότητα της ακολουθίας σχετικά με το βιολογικό στόχο (π.χ. πλήρους έναντι μερικής κάλυψης ενός γονιδίου ή ενός γονιδιώματος). Οι τρεις μεγαλύτερες βάσεις νουκλεοτιδικών δεδομένων που είναι ελεύθερα διαθέσιμες είναι οι:

- GenBank στο National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)
- DNA Data Bank of Japan (DDBJ) στο Center for Information Biology (CIB) (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>)
- EMBL_Bank στο European Bioinformatics Institute (EBI) (<http://www.ebi.ac.uk/embl/index.html>)

Οι βάσεις αυτές σε συνεργασία έχουν δημιουργήσει την International Nucleotide Sequence Database Collaboration (<http://www.insdc.org/>). Η συνεργασία μεταξύ τους περιλαμβάνει τη δημιουργία κοινών κανόνων για την ταξινόμηση και το σχολιασμό των δεδομένων και την καθημερινή ανταλλαγή εγγραφών που κατατίθενται ανεξάρτητα σε κάθε βάση δεδομένων. Μία τυπική εγγραφή στη μορφοποίηση της GenBank αποτελείται από γραμμές. Η πρώτη λέξη κάθε γραμμής υποδηλώνει το είδος της πληροφορίας που ακολουθεί. Κάθε εγγραφή τελειώνει με τους χαρακτήρες //. Η νουκλεοτιδική ακολουθία μπορεί να ανακτηθεί στη μορφοποίηση FASTA. Η πρώτη γραμμή ξεκινά με το χαρακτήρα > και δίνει μία σύντομη περιγραφή της ακολουθίας, η οποία εμφανίζεται στις επόμενες γραμμές, όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.1.

```
>gi|209751317|gb|EU891385.1| Escherichia coli regulator for SOS regulon (ECs5026) gene, complete cds
> ATGAAAGCGTTAACGGCCAGGCAACAAGAGGTGTTTGATCTCATCCGTGATCAGCCAGACAGGTA
A TGCCTGCCGACGCGTGCAGGAAATCGCGCAGCGTTTGGGGTTCGGTTCGCCAAACGCGCTGAAGAATCT
T GAAGGCGCTGGCAGCGCAAGGCGTAAATTGAAATTTGTTCCGGCGCATCACGCGGGATTCTGTCTGTTGCAG
G GAAGAGGAAGAAGGGTTGCCACTGGTAGGTCTGTGGCTGCCGGTGAACCGCTTCTGGCGCAACAGCATA
G TTGAAGGTCAATTATCAGGTTCGATCCTTTCCTTGTTCAGCCGAATGCTGATTTCTCTGCTGCGCGTCAGCGG
T GATGTCGATGAAAGATATCGGCATTATGGATGGCGACTTGCTGGCAGTGCATAAACTCAGGATGTACGT
G AACGGTCAGGTCGTTGTGCGCACGTATTGATGACGAAGTTACCGTTAAGCGCCTGAAAAACAGGGCAATA
A AAGTCGAACGTGTTGCCAGAAAAATAGCGAGTTTAAACCAATTGTCGTTGACCTTCGTCAGCAGAGCTTCAC
A CATTGAAGGGCTGGCGGTTGGCGTTATTCGCAACGGCGACTGGCTGTAA
C
```

Εικόνα 2.1:Νουκλεοτιδική ακολουθία σε μορφοποίηση FASTA

Στη συγκεκριμένη εργασία, η ανάκτηση των αλληλουχιών DNA και RNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της ΒΔ GenBank, η οποία υποστηρίζεται από το NCBI (National Center for Biotechnology Information). Οι εγγραφές, οι οποίες είναι καταχωρημένες συνοδεύονται και από περαιτέρω πληροφορίες και σχόλια που αφορούν την ακολουθία. Η ανάκτηση δεδομένων γίνεται μέσω του συστήματος Entrez στο δικτυακό τόπο www.ncbi.nlm.nih.gov, χρησιμοποιώντας είτε το όνομα, είτε το σύμβολο ή τον αριθμό καταχώρησης της αλληλουχίας, ή ακόμα επιλεγμένες λέξεις-κλειδιά.

2.7.3 Αναζήτηση πρωτεϊνικών αλληλουχιών

Η UniProt (<http://www.uniprot.org/>) αποτελεί την περιεκτικότερη παγκόσμια συλλογή πληροφοριών για πρωτεΐνες (ακολουθία και λειτουργία), η οποία προέκυψε από τη συνεργασία των ΒΔ:

- Swiss-Prot, η οποία παρέχει ένα υψηλό επίπεδο σχολιασμού (όπως περιγραφή της λειτουργίας μιας πρωτεΐνης, των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, κ.λ.π.), ένα ελάχιστο επίπεδο πλεονασμού και υψηλό επίπεδο ολοκλήρωσης – διασύνδεσης με άλλες ΒΔ.
- TrEMBL, που αποτελεί το συμπλήρωμα της Swiss-Prot. Περιλαμβάνει εγγραφές που δεν έχουν ακόμα ενσωματωθεί στη Swiss-Prot και έχουν προκύψει από τη μετάφραση των καταχωρημένων νουκλεοτιδικών εγγραφών της EMBL. Ο σχολιασμός της γίνεται αυτοματοποιημένα.
- PIR, που προέκυψε από τον Atlas of Protein Sequence and Structure (1965-1978) της Margaret Dayhoff και εξελίχθηκε σε μια ολοκληρωμένη πηγή δεδομένων και αναλυτικών εργαλείων.

2.7.4 Εξειδικευμένη αναζήτηση στη Flybase

Η Flybase αποτελεί μια εξειδικευμένη βάση δεδομένων του γονιδιώματος της *Drosophila*, η οποία είναι συγγενικό είδος με το δάκο. Στη συγκεκριμένη ΒΔ, για κάθε καταχωρημένη αλληλουχία δίνονται ποικίλες πληροφορίες όπως η οργάνωση του εκάστοτε γονιδίου, η θέση του στο χρωμόσωμα, ρυθμιστικά στοιχεία κτλ. Επίσης, υπάρχουν υπερσύνδεσμοι που οδηγούν τον χρήστη στη βιβλιογραφία των πληροφοριών που αναζητά.

2.7.5 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)

Το πρόγραμμα Blast (Basic Local Alignment Search Tool) είναι ένα πρόγραμμα αναζήτησης τοπικών ευθυγραμμίσεων και αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο σύγκρισης και στοίχισης νουκλεοτιδικών ή πρωτεϊνικών αλληλουχιών. Το Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=comgen&part=blast) εντοπίζει ομόλογες περιοχές, κατατεθειμένες στις ΒΔ, που εμφανίζουν τοπική ομοιότητα με μέρος ή ολόκληρη την αλληλουχία που έχει εισαχθεί από το χρήστη. Συνήθως, η αναζήτηση δεν γίνεται νουκλεοτίδιο-νουκλεοτίδιο ή αμινοξύ-αμινοξύ αλλά μέσω λέξεων (words). Το μήκος των λέξεων συμβολίζεται με W και ορίζεται W=11 για νουκλεοτιδικές αλληλουχίες και W=3 για αμινοξικές αλληλουχίες. Στην εύρεση του αποτελέσματος της αναζήτησης σημαντικό ρόλο παίζει η στατιστική εμπιστοσύνη, για αυτό και τις περισσότερες φορές ορίζεται E-value < 1e⁻³. Το πρόγραμμα χωρίζεται σε επιμέρους κατηγορίες ανάλογα με το είδος της αναζήτησης.

Πρόγραμμα	Ακολουθία επερώτησης (Query)	Ακολουθία Βάσης Δεδομένων (ΒΔ)
Blastn	νουκλεοτιδική	νουκλεοτιδική
Blastp	πρωτεϊνική	πρωτεϊνική
Blastx	μεταφρασμένη νουκλεοτιδική	πρωτεϊνική
Tblastn	πρωτεϊνική	μεταφρασμένη νουκλεοτιδική
Tblastx	μεταφρασμένη νουκλεοτιδική	μεταφρασμένη νουκλεοτιδική

Πίνακας 2.1: Τα προγράμματα της υποομάδας Basic Blast

Αναλυτικότερα, τα 5 βασικά προγράμματα Blast:

- BLASTn (σύγκριση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών)

Πρόκειται για την γενική έκδοση του BLAST για αναζήτηση νουκλεϊκών οξέων. Αποτελεί τη βέλτιστη επιλογή για τον εντοπισμό παρόμοιων, αλλά όχι πανομοιότυπων ακολουθιών.

- BLASTp (σύγκριση πρωτεϊνικών αλληλουχιών)

Η βασική έκδοση του BLAST για σύγκριση πρωτεϊνών. Όπως και οι υπόλοιποι αλγόριθμοι της οικογένειας, έχει σχεδιαστεί για να εντοπίζει τοπικές ευθυγραμμίσεις. Ωστόσο στην περίπτωση που η ευθυγράμμιση εκτείνεται σε ολόκληρο το μήκος της ακολουθίας, ο BLASTp θα επιστρέψει πλήρη ευθυγράμμιση.

- BLASTx

Δέχεται ως επερώτηση νουκλεοτιδική ακολουθία, εξάγει το προϊόν της μετάφρασης και των δύο (συμπληρωματικών) κλάδων της και αναζητά την πρωτεϊνική ακολουθία που παρήγαγε σε βάση αμινοξικών ακολουθιών. Βασικό στοιχείο της διαδικασίας είναι το γεγονός ότι η μετάφραση γίνεται και με τα 6 πιθανά αναγνώστικά πλαίσια (3 για κάθε αλυσίδα).

- tBLASTn

Δέχεται ως επερώτηση αμινοξική ακολουθία και την αναζητά σε νουκλεοτιδική βάση δεδομένων, την οποία πρωτίστως έχει μεταφράσει με δυναμικό τρόπο. Η μετάφραση γίνεται και με τα 6 πιθανά πλαίσια. Η μετάφραση της ακολουθίας και με τα 6 δυνατά πλαίσια είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στις περιπτώσεις όπου το πλαίσιο ανάγνωσης δεν είναι γνωστό ή έχει καταστραφεί λόγω λαθών που έχουν οδηγήσει σε μετατόπισή του. Η βασική του ουσιαστική διαφορά ως προς το κλασικό BLASTp είναι το γεγονός ότι συχνά χρησιμοποιούνται βάσεις που περιέχουν νουκλεοτιδικές ακολουθίες (expressed sequence tags, draft genome records) πέρα από αυτές που μεταφράζονται σε πρωτεΐνες και συνεπώς περιέχονται στις πρωτεϊνικές βάσεις.

- tBLASTx

Τόσο η είσοδος όσο και η βάση αναζήτησης είναι αρχικά σε μορφή ακολουθίας νουκλεοτιδίων. Ωστόσο, η καθ' εαυτού αναζήτηση είναι σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Ο αλγόριθμος μεταφράζει τόσο την ακολουθία εισόδου όσο και την βάση, με τα 6 δυνατά πλαίσια μετάφρασης.

2.7.6 Clustal

Ο αλγόριθμος Clustal χρησιμοποιείται για την ολική στοίχιση δυο ή περισσότερων αλληλουχιών με σκοπό τον εντοπισμό ομοιοτήτων και διαφορών μεταξύ τους. Στη συγκεκριμένη εργασία, χρησιμοποιώντας το CLUSTALW μέσω του διαδικτύου (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>), κατασκευάστηκε μια πολλαπλή στοίχιση με όλες τις ακολουθίες.

2.7.7 Αναζήτηση ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης

Ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (Open Reading Frame, ORF) ονομάζεται η αλληλουχία βάσεων ενός γονιδίου, και του mRNA του, η οποία κωδικοποιεί μια πολυπεπτιδική αλυσίδα, αρχίζει με το κωδικόνιο έναρξης και τελειώνει με το κωδικόνιο λήξης. Η διαδρομή αυτή από το κωδικόνιο έναρξης μέχρι το κωδικόνιο λήξης ακολουθεί το βήμα τριπλέτας (το κωδικόνιο έναρξης περιλαμβάνεται στο πλαίσιο ανάγνωσης ενώ το κωδικόνιο λήξης όχι). Η αναζήτηση του ORF μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση ενός εργαλείου που ονομάζεται ORF FINDER και είναι διαθέσιμο διαδικτυακά στη διεύθυνση <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>. Η συγκεκριμένη εφαρμογή προτείνει τα πιθανά ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης και είναι στην ευχέρεια του χρήστη να επιλέξει το κατάλληλο. Μέσω και των υπολοίπων εφαρμογών του NCBI μπορεί να επιτευχθεί άμεσα και επεξεργασία της αλληλουχία του ORF, μετάφραση σε πρωτεϊνική αλληλουχία και σύγκριση με αλληλουχίες που βρίσκονται διαθέσιμες στις Β.Δ

2.7.8 Omiga

Το πρόγραμμα Omiga χρησιμοποιείται για την ανάλυση νουκλεοτιδικών και πρωτεϊνικών αλληλουχιών. Το συγκεκριμένο πρόγραμμα δίνει τη δυνατότητα αποθήκευσης, αρχειοθέτησης και επεξεργασίας αλληλουχιών. Μερικές από τις δυνατότητές του είναι η εξής:

- προσδιορισμός ύπαρξης θέσεων περιορισμού
- αναζήτηση δομικών μοτίβων
- αναζήτηση αναγνωστικών πλαισίων
- στοίχιση δύο ή περισσότερων αλληλουχιών
- σχεδιασμός ομόλογων εκκινήτων

ΥΛΙΚΑ

- ❖ Αντιβιοτικό αμπικιλλίνη (100mg/ml): 100 mg ampicillin σε 1 ml ddH₂O. Διατήρηση στους -20°C.
- ❖ Στερεό LB (LB-agar) (1 L): Βακτοτρυπτόνη (10 gr), Εκχύλισμα ζύμης (5 gr), Άγαρ (15 gr), NaCl (5 gr) pH 7. Αποστείρωση στο αυτόκαυστο (20 λεπτά σε 15lb/sq.in.).
- ❖ Υγρό LB (1 L): Βακτοτρυπτόνη (10 gr), Εκχύλισμα ζύμης (5 gr), NaCl (5 gr) pH 7. Αποστείρωση στο αυτόκαυστο (20 λεπτά σε 15lb/sq.in.).
- ❖ Υγρό SOC (1 L): Βακτοτρυπτόνη (20 gr), Εκχύλισμα ζύμης (5 gr), NaCl (0.5 gr), 250 mM KCl (10 ml) pH 7.2. Αποστείρωση σε αυτόκαυστο και στη συνέχεια προστίθεται 2 M MgCl₂ (5 ml) και 1 M Γλυκόζη (20 ml).
- ❖ NZY υπερκείμενη αγαρόζη (1 L): NaCl (5 gr),
- ❖ MgSO₄*7 H₂O (2 gr), Εκχύλισμα ζύμης (5 gr), NZ αμίνη (10 gr), Αγαρόζη (0.7% w/v), pH 7.5. Αποστείρωση στο αυτόκαυστο (20 λεπτά σε 15lb/sq.in.).
- ❖ NZY Άγαρ (1 L): NaCl (5 gr), MgSO₄*7 H₂O (2 gr), Εκχύλισμα ζύμης (5 gr), NZ αμίνη (10 gr), Άγαρ (15 gr), pH 7.5. Αποστείρωση στο αυτόκαυστο (20 λεπτά σε 15lb/sq.in.).
- ❖ Διάλυμα ηλεκτροφόρησης 5X TBE (1 L): Trisbase (54 gr), Βορικό οξύ (27.5 gr), 0.5 M EDTA (20 ml).
- ❖ Βρωμιούχο αιθίδιο (EthBr) (20 mg/ml): 0.2 gr EthBr σε 10 ml ddH₂O. Έντονη ανάδευση. Διατήρηση στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου.
- ❖ Διάλυμα χρωστικής 6X: 0.25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0.25% κυανού της ξυλόλης, 15% φικόλλη σε ddH₂O.
- ❖ X-Gal (20 mg/ml): 400 mg X-Gal σε 10 ml DMF (dimethylformamide). Διατήρηση στο σκοτάδι σε θερμοκρασία -20°C.
- ❖ IPTG 1M: 238 mg IPTG σε 1 ml ddH₂O. Διατήρηση σε θερμοκρασία -20°C.
- ❖ Διάλυμα SM: 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.2% MgSO₄* 7 H₂O, 0.01% ζελατίνη.
- ❖ Διάλυμα 20X SSC: 0.3 M Κιτρικό νάτριο pH 7, 3 M NaCl
- ❖ Διάλυμα Αποδιάταξης: 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl
- ❖ Διάλυμα Εξουδετέρωσης: 0.5 M Tris-HCl pH 7.5, 1.5 M NaCl.
- ❖ Διάλυμα Υβριδοποίησης: 6X SSC, 5X Denhardt's, 0.5% SDS.
- ❖ Διάλυμα 50X Denhardt's: 1% φικόλλη, 1% PVP, 1% BSA. Αποστείρωση με χρήση πορώδους φίλτρου (0.45 μm). Διατήρηση σε θερμοκρασία -20°C.
- ❖ Διάλυμα Πλύσης A: 2X SSC, 0.1% SDS.
- ❖ Διάλυμα Πλύσης B: 0.2X SSC, 0.1% SDS.
- ❖ Διάλυμα A: 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl.
- ❖ Διάλυμα B: Διάλυμα A, 1% Διάλυμα Blocking.
- ❖ Διάλυμα Blocking (10%): Αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη (10 gr) σε 100 ml Διαλύματος A.
- ❖ Διάλυμα C: 100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

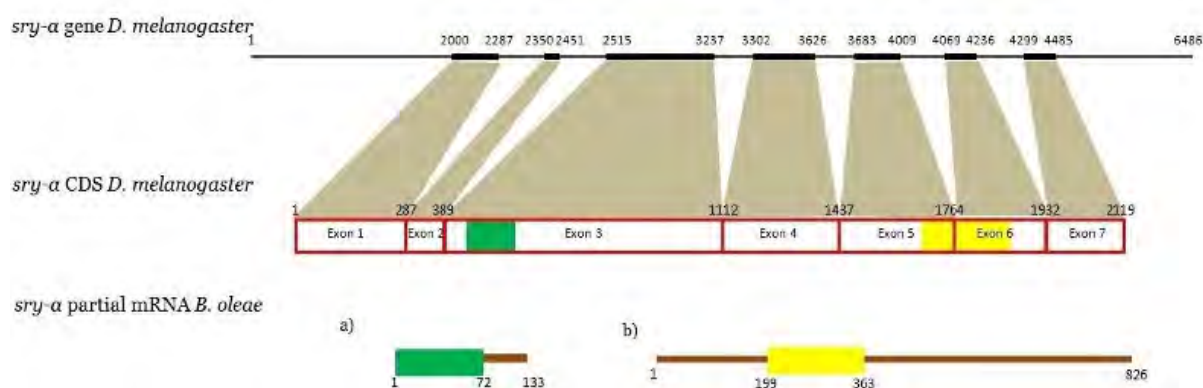


3. Μοριακή ανάλυση του γονιδίου *serendipity-alpha* (*sry-a*)

Η παρούσα διπλωματική εργασία εστίασε στη μοριακή ανάλυση του γονιδίου *sry-a* του δάκου και συγκεκριμένα, στην ενίσχυση και ταυτοποίηση τμημάτων του γονιδίου, με απώτερο σκοπό, τα τμήματα αυτά να χρησιμοποιηθούν για την απομόνωση της αλληλουχίας του γονιδίου από φαγικούς κλώνους γονιδιωματικής βιβλιοθήκης και τον εντοπισμό ρυθμιστικών στοιχείων όπως είναι η αλληλουχία του υποκινητή.

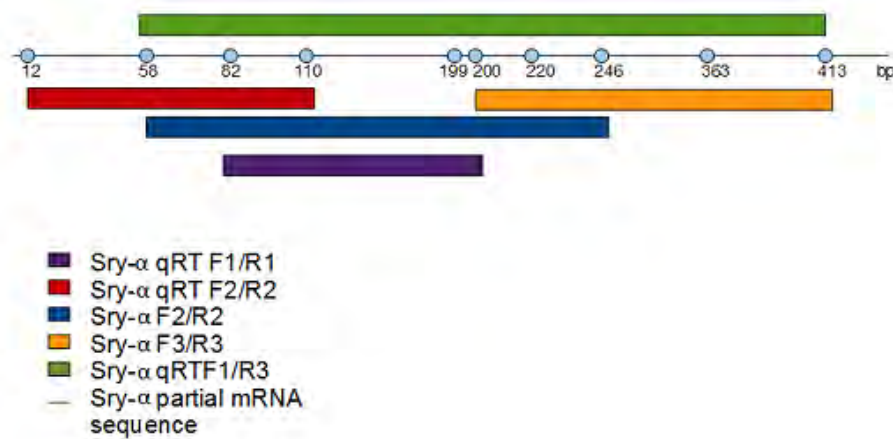
3.1 Εντοπισμός και ενίσχυση μεταγραφόμενων αλληλουχιών με ομόλογους εκκινητές

Στα πρώτα βήματα της πειραματικής διαδικασίας, ελέγχθηκαν ζεύγη εκκινητών για την ικανότητα τους να ενισχύουν τμήματα της μεταγραφόμενης αλληλουχίας. Για τον σχεδιασμό κατάλληλων εκκινητών χρησιμοποιήθηκαν τμήματα από μεταγραφόμενες αλληλουχίες του κεφαλιού του εντόμου που προέκυψαν με ανάλυση RNA-seq. Από τη διαδικασία αυτή εντοπίστηκαν δυο αλληλουχίες συνολικού μεγέθους 133 bp και 836 bp με ομολογία προς το γονίδιο *sry-a*, βάσει των οποίων σχεδιάστηκαν οι εκκινητές *sry-a* F1/R1, *sry-a* F2/R2, *sry-a* F3/R3, *sry-a* qRT F1/R1 και *sry-a* qRT F2/R2 (Παράρτημα Ι) με τη χρήση του προγράμματος OMIGA σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου.



Εικόνα 3.1: Απεικόνιση *in silico* ανάλυσης των διαθέσιμων μεταγραφόμενων αλληλουχιών του *sry-a* γονιδίου του δάκου για τον προσδιορισμό της δομής του και την εύρεση της ομολογίας του με το συγγενικό είδος *D. melanogaster*. Με μαύρο χρώμα απεικονίζεται η γονιδιωματική αλληλουχία του γονιδίου στη *Drosophila* και με έντονη σκίαση τα εξόνια της. Επιπλέον σημειώνεται και η αντιστοιχία των βάσεων των εξονίων μεταξύ γονιδιωματικής και κωδικής DNA αλληλουχίας (CDS) στον συγγενή οργανισμό. Με διαφορετικά χρώματα (κίτρινο, πράσινο) δίνονται οι ομόλογες αλληλουχίες που καθορίστηκαν μέσω BLASTX, μεταξύ της CDS αλληλουχίας της *Drosophila* (κόκκινο πλαίσιο) και των διαθέσιμων mRNA αλληλουχιών του *sry-a* στο δάκο (καφέ γραμμή) [a] αλληλουχία από RNA-seq, b) μεταγραφόμενη αλληλουχία που ανακτήθηκε από τη βάση δεδομένων]. Πηγή: Μαυρίδου, 2014

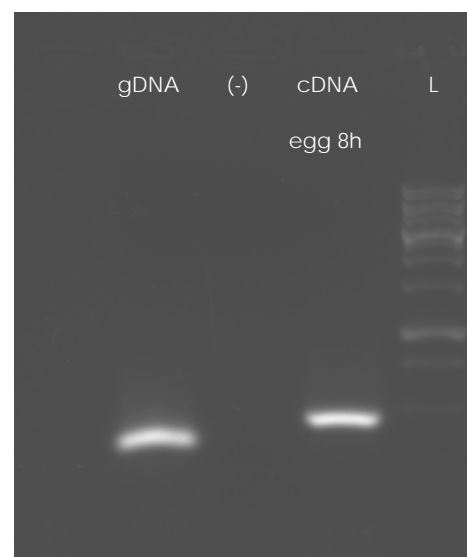
Αρχικά, χρησιμοποιήθηκαν όλα τα ζεύγη εκκινητών για ενίσχυση με PCR τμημάτων του γονιδίου. Η PCR πραγματοποιήθηκε με μήτρα τόσο γονιδιωματικό DNA όσο και cDNA δάκου, το οποίο προέκυψε από απομόνωση ολικού RNA από αυγό 8 ωρών μετά την ωοαπόθεση και σύνθεση με αντίστροφη μεταγραφή, και στη συνέχεια τα προϊόντα ενίσχυσης ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%, 0,5X TBE προκειμένου να επιλέξουμε ποιο τμήμα της αλληλουχίας θα χρησιμοποιηθεί ως ανιχνευτής για την σάρωση των φαγικών βιβλιοθηκών. Στην Εικόνα 3.2 απεικονίζεται το προϊόν της αντίδρασης PCR που αναμένεται από κάθε ζεύγος και ποιο τμήμα της μεταγραφόμενης αλληλουχίας ενιχύει.



Εικόνα 3.2: Απεικόνιση τμημάτων που ενισχύονται με την αντίδραση της PCR χρησιμοποιώντας τα παραπάνω ζεύγη εκκινητών.

Τελικά, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές *sry-α* qRTF1 και *sry-α* R3 για ενίσχυση με PCR ενός τμήματος του γονιδίου μεγέθους 331 bp. Η αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε με μήτρα τόσο γονιδιωματικό DNA όσο και cDNA δάκου (από αυγό 8 ωρών) και στη συνέχεια τα προϊόντα ενίσχυσης ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%, 0,5X TBE (Εικόνα 3.3). Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης έδειξαν πως ενώ με μήτρα το cDNA το προϊόν της ενίσχυσης είχε το αναμενόμενο μέγεθος, η PCR με μήτρα το γονιδιωματικό DNA έδωσε ένα προϊόν μεγέθους περίπου 388 bp. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την πιθανότητα ύπαρξης ιντρονίου στην αλληλουχία του γονιδιωματικού DNA, το οποίο απομακρύνεται κατά τη διάρκεια του ματίσματος στη μεταγραφή και έτσι το μέγεθος του προϊόντος παρουσιάζεται μικρότερο όταν χρησιμοποιείται ως μήτρα το cDNA. Συνεπώς, θεωρήθηκε πως το τμήμα μεγέθους 331bp αντιστοιχεί σε αλληλουχία του *sry-α* στην οποία παρεμβάλλεται κάποιο ιντρόνιο.

Εικόνα 3.3: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων ενίσχυσης του γονιδιωματικού DNA (gDNA) και του cDNA από αυγό 8 ωρών (cDNA egg 8h) με τους εκκινητές *sry-α* qRT F1/*sry-α* R3 (χρησιμοποιήθηκε αρνητικό δείγμα ελέγχου και μάρτυρας μοριακού βάρους 1kb/1000bp Blue DNA Ladder).



Οι διαθέσιμες μεταγραφόμενες αλληλουχίες του γονιδίου *sry-α* του δάκου χρησιμοποιήθηκαν για τον εντοπισμό ομόλογων αλληλουχιών στο συγγενικό είδος *D. melanogaster* μέσω BLASTX. Κατά τη διαδικασία αυτή διαπιστώθηκε ότι το δεύτερο τμήμα της μεταγραφόμενης αλληλουχίας του δάκου (Εικόνα 3.1b) εμφανίζει ομολογία με τμήματα του πέμπτου και έκτου εξονίου στη *Drosophila*, ανάμεσα στα οποία, σύμφωνα με τη δομή του ορθόλογου γονιδίου, παρεμβάλλεται ιντρόνιο μήκους 57 bp. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει τη διαφορά στο μέγεθος που παρουσιάζουν τα προϊόντα ενίσχυσης με μήτρα το γονιδιωματικό DNA και το cDNA.

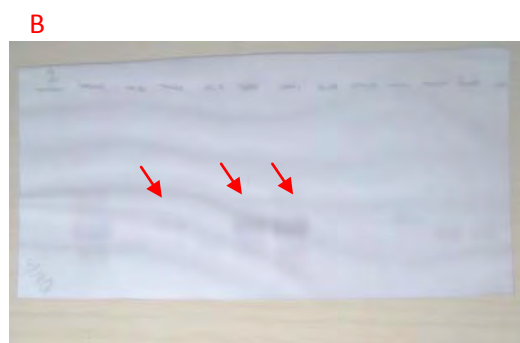
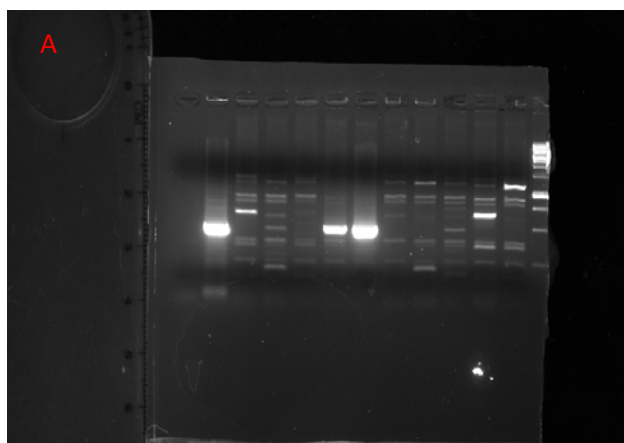
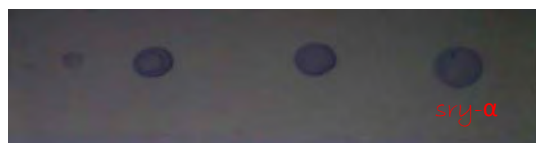
3.2 Διαλογή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης του δάκου

Η "σάρωση" της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης του δάκου πραγματοποιήθηκε με σκοπό την απομόνωση της πλήρους δυνητικά αλληλουχίας του γονιδίου. Για τον εντοπισμό και την ταυτοποίηση φαγικών κλώνων που περιέχουν την αλληλουχία του γονιδίου *sry-α* πραγματοποιήθηκε διαλογή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης, με ανιχνευτή το τμήμα του γονιδίου του προκύπτει από ενίσχυση με μήτρα το γονιδιωματικό DNA δάκου (όπως αναφέρθηκε παραπάνω). Το τμήμα αυτό του γονιδίου απομονώθηκε με ανάκτηση DNA από το πήκτωμα αγαρόζης (gel extraction) που ηλεκτροφορήθηκαν τα προϊόντα ενίσχυσης.

Το προϊόν ενίσχυσης των εκκινητών *sry-α* qRT F1/ *sry-α* R3 μεγέθους 388 bp σημάνθηκε με βιοτίνη με τη μέθοδο τυχαίων εκκινητών με χρήση του Hexa Label™ DNA Labelling kit (Fermentas), ώστε να χρησιμοποιηθεί ως ομόλογος ανιχνευτής στη διαλογή και ακολούθησε έλεγχος της ικανότητας υβριδισμού του σε συμπληρωματικές αλληλουχίες με ικανοποιητικά αποτελέσματα (Εικόνα 3.4). Ακόμα, πραγματοποιήθηκε τιτλοδότηση της φαγικής γονιδιωματικής βιβλιοθήκης ώστε να προσδιοριστεί ο τίτλος της (αριθμός πλακών) και να καθοριστεί η ακριβής ποσότητα που θα χρησιμοποιηθεί κατά τη διαλογή για να μεγιστοποιηθεί η πιθανότητα εύρεσης των φαγικών κλώνων που περιέχουν το προς ανάλυση γονίδιο.

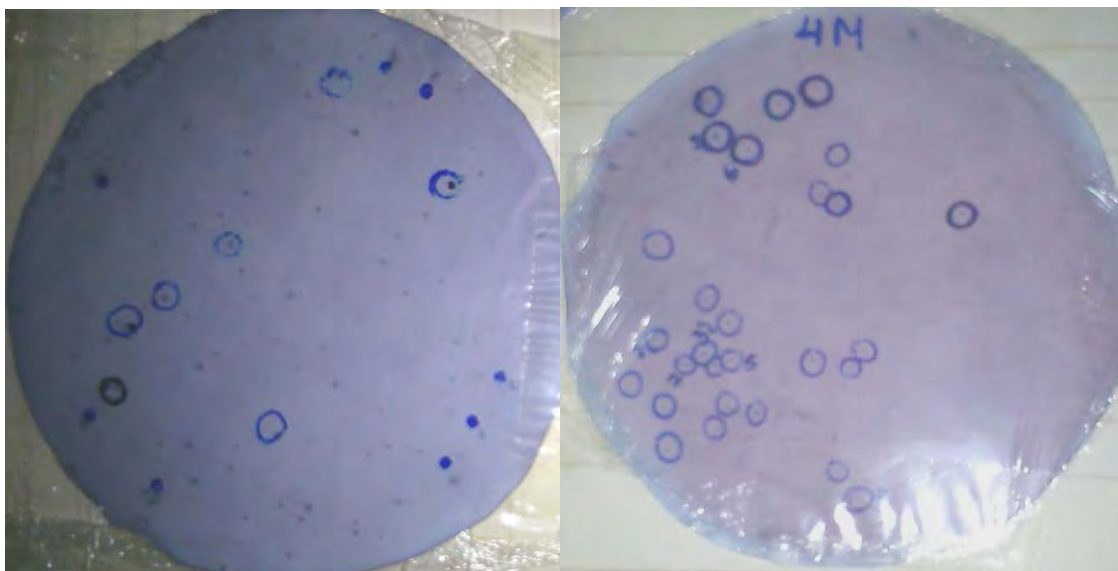
Για την επιλογή των βακτηριογράφων που χρησιμοποιήθηκαν στην διαλογή βιβλιοθηκών, πραγματοποιήθηκε σάρωση της βιβλιοθήκης μέσω ενίσχυσης με αντίδραση PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές *sry-a* qRT F1/ *sry-a* R3 και τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν (Εικόνα 3.5). Το πήκτωμα ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιήθηκε για ανάλυση κατά Southern, προκειμένου να επιβεβαιωθεί το αποτέλεσμα, με ανιχνευτή τμήμα του γονιδιωματικού DNA που αποτελεί προϊόν ενίσχυσης των εκκινητών *sry-a* qRT F1/ *sry-a* R3 (Εικόνα 3.4). Με βάση την εμφάνιση σήματος της μεμβράνης επιλέχθηκαν να χρησιμοποιηθούν για διαλογή της βιβλιοθήκης οι φαγικοί κλώνοι που ονομάζονται Φ222, Φ224 και Φ225.

Εικόνα 3.4: Spotting DNA ανιχνευτή δάκου για το προϊόν των εκκινητών *sry-a* qRT F1/*sry-a* R3



Εικόνα 3.5: Ανάλυση κατά Southern των PCR προϊόντων του γονιδιωματικού DNA του δάκου με τους εκκινητές *sry-a* qRT F1/ *sry-a* R3.

Στη συνέχεια, ακολούθησε μια πρωτογενής διαλογή της βιβλιοθήκης (primary screening) κατά τη διάρκεια της οποίας επιλέχθηκαν περιοχές ανασυνδυασμένων φάγων όπου δόθηκε το σήμα υβριδισμού και έπειτα, ακολούθησε δευτερογενής διαλογή βιβλιοθηκών (secondary screening), όπου επιλέχθηκαν απομονωμένες φαγικές πλάκες. Πιο συγκεκριμένα, από την πρωτογενή διαλογή συλλέχθηκαν δέκα περιοχές ανασυνδυασμένων φάγων. Κάθε μια από τις περιοχές αυτές χρησιμοποιήθηκε για δευτερογενή διαλογή με σκοπό τη συλλογή των απομονωμένων πλέον φαγικών πλακών. Τα καλύτερα αποτελέσματα σήματος τα είχε η περιοχή 4M (που προήλθε από πρωτογενή διαλογή της βιβλιοθήκης του φάγου 224) από την οποία σε δευτερογενή διαλογή απομονώθηκαν 4 απομονωμένες φαγικές πλάκες (Εικόνα 3.6).



Εικόνα 3.6: Δείγματα μεμβρανών μετά από εμφάνιση σήματος σε πρωτογενή (Α) και δευτερογενή (Β) διαλογή.

3.3 Ταυτοποίηση της αλληλουχίας με κλωνοποίηση και αλληλούχηση

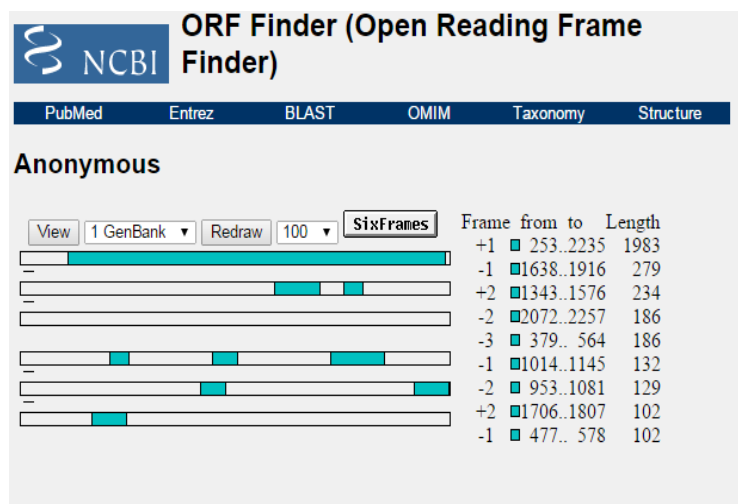
Αρχικά, πραγματοποιήθηκε προετοιμασία των φάγων προκειμένου να αυξηθεί το φαγικό φορτίο (phage preps) και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης 1%, 0,5X, με σκοπό να πραγματοποιηθεί ποσοτικοποίηση. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν πέψεις με τα ένζυμα περιορισμού *EcoRI* και *HindIII* καθώς και διπλή πέψη με συνδυασμό αυτών των δύο ενζύμων. Τα προϊόντα των πέψεων ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αгарόζης 1% 1X TBE και ακολούθησε υβριδοποίηση κατά Southern με ανιχνευτή το προϊόν ενίσχυσης των εκκινητών *sry-a* qRT F1/ *sry-a* R3. Παρόλα αυτά, δεν παρατηρήθηκε σήμα υβριδοποίησης, ώστε να απομονωθούν τα αντίστοιχα τμήματα και να κλωνοποιηθούν, για λόγους που σχολιάζονται στη συζήτηση. Παράλληλα με την υλοποίηση του συγκεκριμένου πειράματος, ολοκληρώθηκε η αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος του δάκου, με αποτέλεσμα να είναι πλέον εφικτό η πειραματική διαδικασία να συνεχιστεί με *in silico* ανάλυση.

3.4 *In silico* ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδίου *sry-a*

Με στόχο την ανάλυση της δομής του γονιδίου *sry-a*, εντοπίστηκε το scaffold, το οποίο περιείχε την αλληλουχία του συγκεκριμένου γονιδίου, συγκρίνοντας τις αλληλουχίες των scaffolds με αυτήν του μεταγράφου του γονιδίου *sry-a* (Παράρτημα II) από τα δεδομένα του RNA-seq. Σε πρώτο στάδιο, εντοπίστηκε το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF, Open Reading Frame) χρησιμοποιώντας την εφαρμογή του NCBI, ORF Finder και εισάγοντας τη διαθέσιμη μεταγραφόμενη αλληλουχία μήκους 2258 bp (Εικόνα 3.7). Από τα προτεινόμενα από την εφαρμογή πλαίσια επιλέχθηκε το πρώτο, μήκους 1983 bp που αντιστοιχεί σε 661 κωδικόνια και κατέπεκτασε σε 660 αμινοξέα. Το μέγεθος της πρωτεΐνης του γονιδίου *sry-a* σε συγγενικά είδη με το δάκο παρουσιάζεται στο Πίνακα 3.1.

Είδος	Μέγεθος πρωτεΐνης σε αμινοξέα (aa)
<i>D. melanogaster</i>	530
<i>C. capitata</i>	660
<i>A. suspensa</i>	646
<i>B. dorsalis</i>	618

Πίνακας 3.1: Το μέγεθος της πρωτεΐνης *sry-a* σε συγγενικά είδη του δάκου της ελιάς *B. oleae*



Εικόνα 3.7: Εντοπισμός του ORF στην μεταγραφόμενη αλληλουχία του γονιδίου *sry-a*

Ο εντοπισμός της αμινοξικής αλληλουχίας έγινε με μετάφραση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας με τη χρήση της εφαρμογής translate από το ExPASy (Bioinformatics Resource Portal), (Εικόνα 3.8). Το παραπάνω αποτέλεσμα επιβεβαιώνεται αν επιλέξουμε στην εφαρμογή ORF Finder την επιλογή blastp και επιλέξουμε την μορφή FASTA για την πρωτεϊνική αλληλουχία (Παράρτημα II).

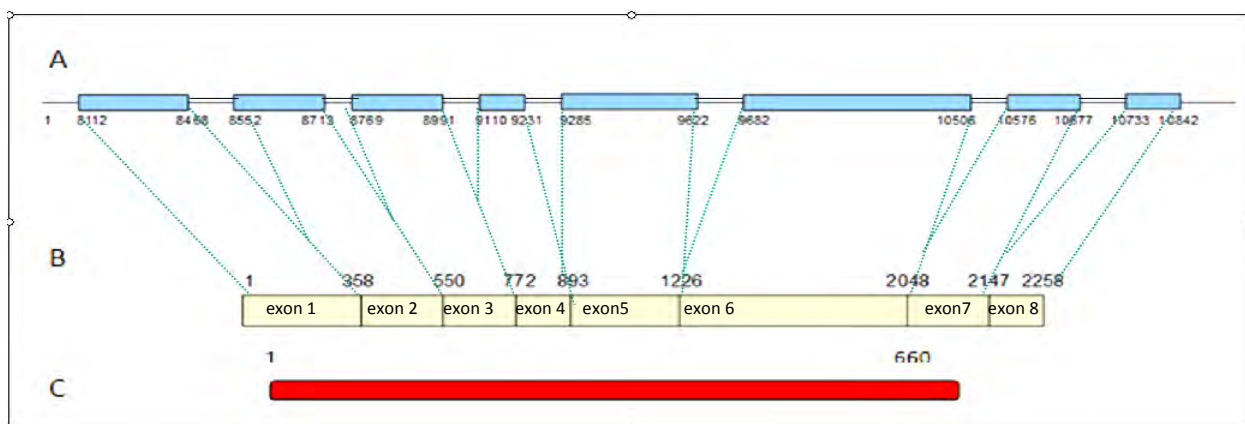


Εικόνα 3.8: Εντοπισμός της αμινοξικής αλληλουχίας με χρήση της εφαρμογής Translate του ExPASy

Το επόμενο βήμα ήταν η ανάλυση της δομής του γονιδίου. Το μέγεθος της αλληλουχίας του γονιδίου *sry-a* του δάκου έχει μέγεθος 3005 bp. Με τη χρήση του προγράμματος blastn (Align Sequences Nucleotide, BLAST) έγινε στοίχιση της μεταγραφόμενης αλληλουχίας και της γονιδιωματικής αλληλουχίας του γονιδίου *sry-a* του δάκου. Από τη στοίχιση έγινε χαρακτηρισμός των ορίων εξονίων-ιντρονίων (Εικόνα 3.10). Επίσης, με το Dot blot έγινε επαλήθευση της σύγκρισης και γραφική απεικόνιση του αποτελέσματος (Εικόνα 3.9). Συνεπώς, το γονίδιο *sry-a* του δάκου περιέχει 8 εξόνια και 7 ιντρόνια ακριβώς όπως συμβαίνει και με το αντίστοιχο γονίδιο στα συγγενικά είδη εντόμων όπως η *Drosophila melanogaster*, η *Anastrophia suspensa* και η *Musca domestica* κ.α.



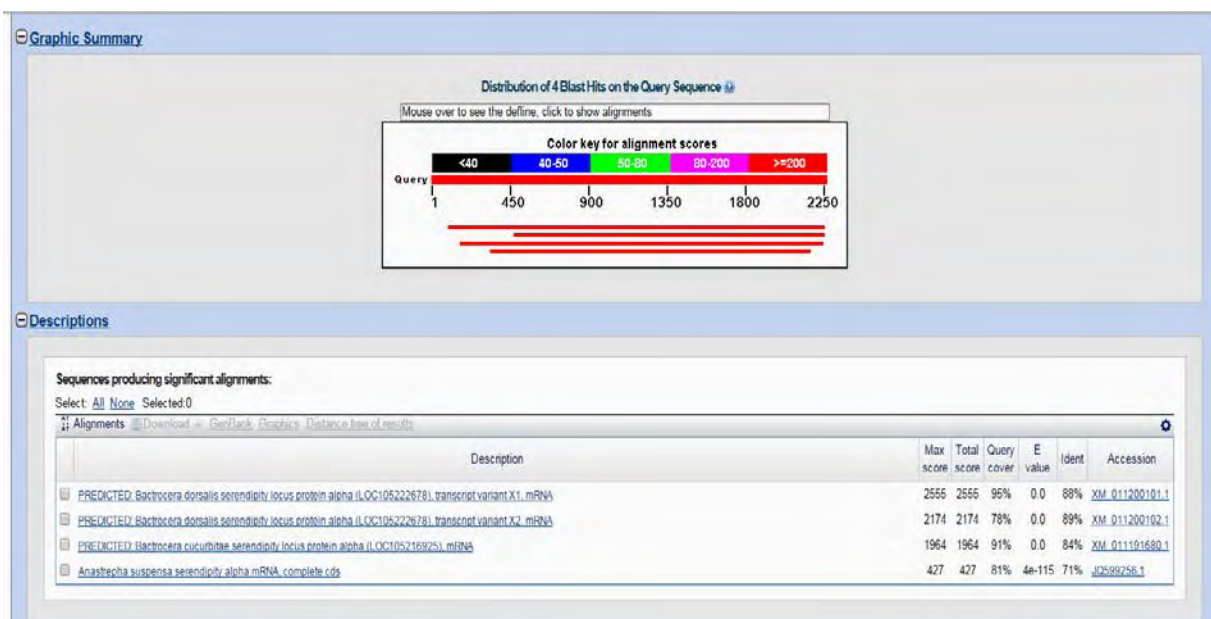
Εικόνα 3.9 : Dot Matrix. Στον κατακόρυφο άξονα είναι η μεταγραφόμενη αλληλουχία ενώ στον οριζόντιο άξονα η γονιδιωματική αλληλουχία. Η γραμμές κατά μήκος του διαγώνιου άξονα αντιπροσωπεύουν τις αλληλουχίες των εξονίων ενώ τα κενά τις αλληλουχίες των ιντρονίων.



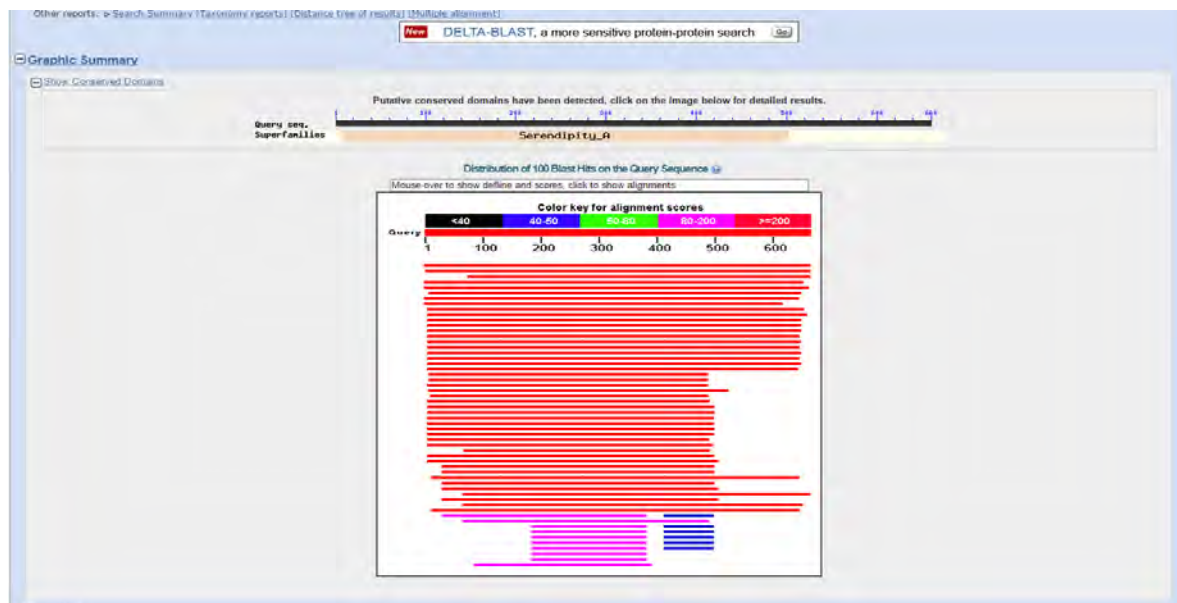
Εικόνα 3.10: Απεικόνιση της *in silico* ανάλυσης της οργάνωσης του γονιδίου *sry-a* στο δάκο. Με μπλε χρώμα (Α) απεικονίζονται οι κωδικές περιοχές (εξόνια) στην υπό ανάλυση γονιδιωματική αλληλουχία (scaffold), με διπλή γραμμή (Α) απεικονίζονται οι αλληλουχίες των ιντρονίων ενώ με κίτρινο χρώμα (Β) απεικονίζεται η μεταγραφόμενη αλληλουχία του γονιδίου. Με κόκκινο χρώμα (C) απεικονίζεται η αμινοξική αλληλουχία του μεταγράφου του γονιδίου *sry-a*.

3.5 Σύγκριση αμινοξικής αλληλουχίας της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το γονίδιο *sry-a*

Η σύγκριση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (μεταγραφόμενη αλληλουχία) με τη χρήση του προγράμματος blastn έδωσε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα ομοιότητας με αλληλουχίες που υπάρχουν στις βάσεις δεδομένων του NCBI, και συγκεκριμένα με τις αλληλουχίες του γονιδίου *sry-a* στα είδη *Bactrocera dorsalis* και *Bactrocera curcubitae* (Εικόνα 3.11). Επιπλέον, η αμινοξική αλληλουχία που προέκυψε με μετάφραση της αλληλουχίας του ORF έδωσε σημαντικά αποτελέσματα ομοιότητας με πρωτεϊνικές αλληλουχίες ακόμα περισσότερων ειδών εντόμων της οικογένεια Tephritidae (Εικόνα 3.12).



Εικόνα 3.11: Γραφική απεικόνιση της στοίχισης της μεταγραφόμενης αλληλουχίας του γονιδίου *sry-a* με τη χρήση του προγράμματος blastn



Εικόνα 3.12α: Γραφική απεικόνιση της στοίχισης της αμινοξικής αλληλουχίας της πρωτεΐνης *Sry-a* με χρήση του προγράμματος blastp



Εικόνα 3.12b: Γραφική απεικόνιση της σύγκρισης αμινοξικών αλληλουχιών. [Οι συγκρινόμενες αλληλουχίες ανήκουν στα παρακάτω είδη: 1) *B. dorsalis*, 2) *B. curcubita*, 3) *A. suspensa*, 4) *C. capitata*, 5) *L. sericata*, 6) *M. domestica*, 7) *D. melanogaster*]

Εικόνα 3.13: Αποτελέσματα πολλαπλή στοίχιση με το πρόγραμμα ClustalW2 των αμινοξικών αλληλουχιών της πρωτεΐνης του γονιδίου *sry-a* των ειδών *B. oleae*, *B. dorsalis*, *B. curcubitae*, *A.suspensa* και *C. capitata*.

74

3.6 *In silico* ανάλυση για τον εντοπισμό της αλληλουχίας του υποκινητή

Η γονιδιωματική αλληλουχία περίπου 2 kb ανοδικά της 5' αμετάφραστης περιοχής του γονιδίου *sry-a* του δάκου χρησιμοποιήθηκε για την ανεύρεση της αλληλουχίας του υποκινητή, με χρήση του εργαλείου Promoter Prediction (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html), το οποίο έχει δημιουργηθεί με βάση το γονιδίωμα της *Drosophila* (Berkeley *Drosophila* Genome Project). Στη συνέχεια, έγινε προσπάθεια αναγνώρισης αλληλουχιών-μοτίβων που χαρακτηρίζουν την αλληλουχία του υποκινητή όπως το TATA box, CCAAT box και CACCC λαμβάνοντας υπόψη την πιθανότητα μετάλλαξης σε κάποιο από τα νουκλεοτίδια της αλληλουχίας (Εικόνα 3.15). Η αλληλουχία 7335' ΠΤΑΤΑΑΤCΑΤΤΑΑΑΑΑΤG GTCTCTCATTGCATTGCTGCCAAATAAGTTT '7385 bp βρίσκεται περίπου 500 bp ανοδικά της 5' UTR, συγκεντρώνει γύρω της αλληλουχίες-μοτίβα και συγκεντρώσε το μεγαλύτερο σκόρ στο πρόγραμμα πρόβλεψης. Συνεπώς, η αλληλουχία αυτή επιλέχθηκε ως πιθανή αλληλουχία του υποκινητή σε σχέση με τις άλλες δυο αλληλουχίες που προτείνει το πρόγραμμα.

Promoter predictions for seq0 :

Start	End	Score	Promoter Sequence
6454	6504		GATTACGATGTATACCTGCGCAGCGTATGCACAAGAATACCCCAAGATTTC
6514	6564		AGCGTGGACCTAAATAATGTCGAAATTATTTTGTAGTAAATTAATTGTTAGC
7335	7385		TTTATAATCATTAAAAATGGTCTCTCATTGCATTGCTGCCAATAAGTTT

Εικόνα 3.14: Πρόβλεψη της αλληλουχίας του υποκινητή από το εργαλείο Promoter Prediction του Berkeley *Drosophila* Genome Project.

The image displays a DNA sequence alignment. A central segment, corresponding to the promoter region 7335-7385 bp, is highlighted in red. This region contains the sequence TTTATAATCATTAAAAATGGTCTCTCATTGCATTGCTGCCAATAAGTTT. Other regions of the sequence are highlighted in blue and green, representing other predicted motifs or conserved areas. The sequence is presented in a monospaced font, typical of bioinformatics software outputs.

Εικόνα 3.15 Η αλληλουχία ανοδικά της 5' UTR του γονιδίου *sry-a* του δάκου στην οποία έγινε εντοπισμός της αλληλουχίας που εκτείνεται από 7335 με 7385 bp (επισήμανση με ροζ χρώμα) και πρόβλεψη μοτίβων υποκινητή εκατέρωθεν της αλληλουχίας αυτής. Με κίτρινο χρώμα έγινε επισήμανση του TATA box (TATAAA), με ανοικτό πράσινο χρώμα του CACCC box και με γαλάζιο χρώμα του CCAAT box.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ



4.Συζήτηση

Το είδος *B. oleae* είναι το κύριο παράσιτο του καρπού της ελιάς και είναι υπεύθυνο για το μεγαλύτερο ποσοστό των οικονομικών απωλειών της καλλιέργειάς της. Τη βάση ελέγχου του πληθυσμού του αποτελούν τα χημικά εντομοκτόνα και με την αποτυχία των φιλικών προς το περιβάλλον μεθόδων ελέγχου που εφαρμόστηκαν, καθίσταται επιτακτική η ανάγκη για περαιτέρω μελέτη του είδους τόσο σε μοριακό, όσο και σε πληθυσμιακό επίπεδο.

Η μέθοδος SIT είχε εφαρμοστεί για τον έλεγχο του δάκου της ελιάς κατά τη δεκαετία του '70 χωρίς όμως επιτυχή αποτελέσματα. Η έρευνα για την ανάπτυξη ενός RIDL συστήματος στον δάκο της ελιάς οδήγησε πρόσφατα στη δημιουργία στελεχών που επάγει τη θνησιμότητα των θηλυκών ατόμων στο στάδιο της προνύμφης. Ωστόσο, παρά την πρόοδο που έχει σημειωθεί, εξακολουθούν να υπάρχουν τα μειονεκτήματα του κόστους χειρισμού και της μαζικής εκτροφής των εντόμων. Για το λόγο αυτό, το ενδιαφέρον στρέφεται στην ανάπτυξη FSEL στελεχών που θα επάγουν τη θνησιμότητα στο εμβρυικό στάδιο. Απαραίτητη προϋπόθεση για τη δημιουργία της επιθυμητής κατασκευής, που θα εισαχθεί στα έντομα, είναι η ύπαρξη της απαραίτητης πληροφορίας και η γνώση των αλληλουχιών των γονιδίων, τα οποία πρόκειται να χρησιμοποιηθούν. Στο συγκεκριμένο σύστημα τα θνησιγόνα ή αποπτωτικά γονίδια βρίσκονται υπό τον έλεγχο ενός ειδικού υποκινητή. Η επιθυμητή εξειδίκευση στο συγκεκριμένο σύστημα δύναται να επιτευχθεί με την τοποθέτηση ενός έμβρυο-ειδικού υποκινητή, ώστε οι απόγονοι των εντόμων να πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης, για να εξασφαλιστεί η διακοπή της ανάπτυξης με αποτέλεσμα την αποφυγή της καταστροφής του καρπού της ελιάς.

Ο υποκινητής του γονιδίου *sry-a*, το οποίο εκφράζεται μόνο κατά τη διάρκεια του κυτταρικού βλαστοδέρματος στην εμβρυογένεση, ικανοποιεί την παραπάνω προϋπόθεση ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά στην κατασκευή, την οποία απαιτεί ένα σύστημα FSEL.

Η παρούσα διπλωματική εργασία εστίασε στον εντοπισμό και την ανάλυση του γονιδίου *sry-a*, το οποίο εκφράζεται αποκλειστικά στα εμβρυογενετικά στάδια του δάκου. Για το γονίδιο *sry-a* έγινε μοριακή ανάλυση με σκοπό την εύρεση ολόκληρης της αλληλουχίας του, τον καθορισμό της δομής του και τον εντοπισμό της αλληλουχίας του υποκινητή του.

4.1 Μοριακή ανάλυση

Αρχικά, βάσει μεταγραφόμενων αλληλουχιών από δεδομένα RNA-seq προηγούμενης ανάλυσης του εργαστηρίου σχεδιάστηκαν ομόλογοι εκκινητές, επιτρέποντας τον εντοπισμό και την απομόνωση τμήματος του γονιδίου *sry-a* στο γονιδίωμα του *B. oleae*. Το συγκεκριμένο τμήμα χρησιμοποιήθηκε ως ανιχνευτής σε διαλογή φαγικής γονιδιωματικής βιβλιοθήκης, στο πλαίσιο της προσπάθειας εύρεσης ολόκληρης της αλληλουχίας του γονιδίου. Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι το ορθόλογο γονίδιο στη *Drosophila melanogaster* έχει μέγεθος περίπου 6500 bp και οι βακτηριοφάγοι, οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης του δάκου μπορούν να ενσωματώσουν τμήματα μεγέθους έως και 15.000 bp, θεωρήθηκε εφικτός ο εντοπισμός φαγικών κλώνων, οι οποίοι περιέχουν μεγάλα τμήματα της αλληλουχίας ή και ολόκληρη την αλληλουχία του γονιδίου. Επίσης, είναι πιθανόν να περιέχονται και γειτονικές αλληλουχίες, οι οποίες ενδεχομένως να περιλαμβάνουν ρυθμιστικά στοιχεία ή και την αλληλουχία του υποκινητή. Σε πρώτη φάση, πραγματοποιήθηκε πρωτογενής σάρωση βιβλιοθήκης, στην οποία εντοπίστηκαν και απομονώθηκαν περιοχές ανασυνδυασμένων φάγων, οι οποίες έδωσαν σήμα υβριδοποίησης και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε δευτερογενής σάρωση βιβλιοθήκης, στην οποία εντοπίστηκαν και απομονώθηκαν φαγικές πλάκες. Οι πλάκες που απομονώθηκαν χρησιμοποιήθηκαν για μόλυνση βακτηρίων MRA' με σκοπό των πολλαπλασιασμό των φάγων σε υγρές καλλιέργειες και των απομόνωση του γενετικού τους υλικού σε υψηλές συγκεντρώσεις. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν πέψεις, τα τμήματα ηλεκτροφορήθηκαν και ακολούθησε ανάλυση κατά Southern χρησιμοποιώντας τον ίδιο ανιχνευτή που αναφέρθηκε προηγουμένως. Τελικά, δεν ανιχνεύτηκε σήμα υβριδισμού σε κάποιο από τα επιμέρους τμήματα των πέψεων ώστε να καταστεί εφικτή η απομόνωση, η κλωνοποίηση και η αλληλούχηση του.

Η έλλειψη ανίχνευσης σήματος μπορεί να είναι απόρροια του ότι η γονιδιωματική βιβλιοθήκη που χρησιμοποιήθηκε ήταν προϊόν ενίσχυσης της αρχικής βιβλιοθήκης που κατασκευάστηκε και πιθανότατα να υπήρξε μειωμένη αντιπροσώπευση του συνολικού γονιδιώματος του δάκου κατά τη διαλογή. Η αντιπροσώπευση κάθε βακτηριοφάγου στη βιβλιοθήκη είναι περίπου 10 φορές. Για την επίλυση αυτού του προβλήματος, σε μελλοντική μελέτη θα μπορούσε να αξιοποιηθεί η χρήση της ανάστροφης PCR (Inverse PCR) σε γονιδιωματικό DNA δάκου, προκειμένου να ενισχυθεί η άγνωστη γονιδιωματική περιοχή εκατέρωθεν του γονιδίου, με απώτερο σκοπό την αλληλούχηση και τον προσδιορισμό της αλληλουχίας του υποκινητή του γονιδίου. Παράλληλα με την αναζήτηση της αλληλουχίας με τη χρήση των πειραματικών εργαλείων της μοριακής βιολογίας, ολοκληρώθηκε η αλληλούχηση του γονιδιώματος του δάκου. Συνεπώς, η αναζήτηση της αλληλουχίας του γονιδίου *sry-a* συνεχίστηκε με ανάλυση *in silico*.

4.2 *In silico* ανάλυση

Το τμήμα του γονιδιώματος, το οποίο περιέχει ολόκληρη την αλληλουχία του γονιδίου *sry-a*, εντοπίστηκε με τη χρήση του προγράμματος *blastn* όπου ως ακολουθία επερώτησης χρησιμοποιήθηκε η αλληλουχία του μεταγράφου του γονιδίου που ήταν ήδη γνωστή από δεδομένα RNA-seq, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως. Το μέγεθος του γονιδίου *sry-a* του δάκου της ελιάς έχει μέγεθος 3005 bp. Η δομή του γονιδίου βρέθηκε με στοίχιση της γονιδιωματικής με την αλληλουχία του μεταγράφου όπου εντοπίστηκαν τα όρια των εξονίων-ιντρονίων. Το γονίδιο *sry-a* του δάκου της ελιάς περιέχει 8 εξόνια και 7 ιντρόνια. Η αλληλουχία του μεταγράφου πρωτύτερα είχε χρησιμοποιηθεί για την ανεύρεση του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης (ORF) με τη χρήση του προγράμματος ORF FINDER του NCBI και επιλέχθηκε αυτό που είχε μέγεθος 1983 bp και είχε τη μεγαλύτερη ομοιότητα στη σύγκριση με τις αμινοξικές αλληλουχίες των πρωτεϊνών που προκύπτουν από το γονίδιο *sry-a* σε συγγενικά είδη εντόμων όπως η *A. suspensa*, η *A. ludens*, η *C. capitata* και η *D. melanogaster*. Εκατέρωθεν της αλληλουχίας του ORF εντοπίστηκαν οι 5' και 3' αμετάφραστες περιοχές μεγέθους 252 bp και 23 bp αντίστοιχα. Η αλληλουχία του ORF μεταφράστηκε με χρήση του προγράμματος ExPASy και βρέθηκε ότι το μέγεθος της αμινοξικής αλληλουχίας είναι 660 αμινοξέα. Η οργάνωση του γονιδίου *sry-a* του στο δάκο *B. oleae* παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με την οργάνωση του *sry-a* σε συγγενικά είδη εντόμων. Το γονίδιο *sry-a* της *D. melanogaster*, της *C. capitata*, της *A. suspensa* οργανώνεται επίσης σε 8 εξόνια και 7 ιντρόνια ενώ το μέγεθος της αμινοξικής του αλληλουχία κυμαίνεται ως εξής στα παραπάνω είδη: 530 αμινοξέα στη *D. melanogaster*, 660 αμινοξέα στην *C. capitata* και 646 αμινοξέα στην *A. suspensa*. Σε πρωτεϊνικό επίπεδο παρατηρούμε ότι οι αλληλουχίες παρουσιάζουν εξαιρετική ομοιότητα ενώ σε νουκλεοτιδικό επίπεδο υπάρχει μικρότερη ομοιότητα, κάτι το οποίο είναι αναμενόμενο εξαιτίας των σιωπηλών μεταλλάξεων και των συνώνυμων κωδικονίων στο γενετικό κώδικα που δεν επιτρέπουν αλλαγές στα νουκλεοτίδια να επηρεάσουν την αμινοξική αλληλουχία και κατ' επέκταση τη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης. Με χρήση του προγράμματος στοίχισης Clustalw βρέθηκαν συντηρημένα αμινοξέα τα οποία επηρεάζουν ενδεχομένως την λειτουργικότητα της πρωτεΐνης για αυτό πιθανόν μεταλλάγματα για τα συγκεκριμένα αμινοξέα να μην ευνοούνται εξελικτικά. Παρόλα αυτά, αξίζει να αναφερθεί ότι τα γονίδια που εμπλέκονται στην ανάπτυξη αναφέρουν τον υψηλό ρυθμό εξέλιξης που χαρακτηρίζει τα γονίδια αυτά σε έντομα της οικογένειας *Drosophilidae* (Schmid and Tautz, 1997). Επιπρόσθετα, το γονιδίωμα του δάκου έχει το διπλάσιο σχεδόν μέγεθος από αυτό της *Drosophila* και ενδεχομένως διαφοροποιημένη οργάνωση, ειδικά των μη κωδικών περιοχών οι οποίες χαρακτηρίζονται από μικρό βαθμό συντήρησης. Η διαφοροποιημένη δομή του γονιδίου *sry-a* επιβεβαιώθηκε με την *in silico* ανάλυση της αλληλουχίας του και συγκεκριμένα με την στοίχιση των αλληλουχιών των δυο ειδών.

Η αλληλουχία του υποκινητή, που επιλέχθηκε με τη χρήση του εργαλείου promoter prediction και περιέχει τα μοτίβα TATA box και CAAT box, βρίσκεται περίπου 500 bp ανοδικά της 5'UTR. Η πειραματική επιβεβαίωση του παραπάνω αποτελέσματος είναι αυτή που θα καθορίσει και την εγκυρότητα του για αυτό μελλοντικά προτείνεται η απομόνωση αυτού του τμήματος του γονιδίου με τη σχεδίαση κατάλληλων εκκινήτων που θα επιτυγχάνουν την ενίσχυση του. Η παρούσα διπλωματική εργασία εντάσσεται σε μια ευρύτερη μελέτη του εργαστηρίου, η οποία αποσκοπεί στην δημιουργία διαγονιδιακών εντόμων που θα συμβάλλουν στον βιολογικό έλεγχο του πληθυσμού του δάκου της ελιάς. Η απομόνωση του υποκινητή του γονιδίου *sry-a*,

το οποίο εκφράζεται στο στάδιο του συγκυτιακού βλαστοδέρματος κατά την εμβρυογένεση και η παράλληλη απομόνωση της κωδικής αλληλουχίας του προαπτωτικού γονιδίου *hid* αποτελούν τα πρώτα βήματα για την εφαρμογή του συστήματος FSEL στο δάκο της ελιάς. Μελλοντικές προσεγγίσεις θα πρέπει να εστιάζουν στη δημιουργία κατασκευών, οι οποίες θα φέρουν τμήματα της αλληλουχίας του υποκινητή έτσι ώστε να περάσουμε στις πρώτες εργαστηριακές δοκιμές των διαγονιδίων που θα φέρουν αυτές τις κατασκευές.

4.3 Συμπεράσματα

Στη παρούσα διπλωματική εργασία αναλύθηκε η αλληλουχία του γονιδίου *serendpity-alpha*, το οποίο είναι ένα από τα γονίδια της πρώιμης ανάπτυξης του δάκου της ελιάς. Σε μελλοντικές μελέτες, αναμένεται η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της *in silico* ανάλυσης πειραματικά και η απομόνωση της αλληλουχίας του υποκινητή έτσι ώστε να είναι εφικτή η κατασκευή ενός συστήματος FSEL, το οποίο θα εξασφαλίζει το θάνατο των εντόμων στο στάδιο της εμβρυογένεσης, ώστε κατά τη μαζική απελευθέρωση των στελεχών που θα φέρουν το σύστημα να επιτυγχάνεται τελικά η μείωση του άγριου πληθυσμού που ευθύνεται για την καταστροφή των καρπών της ελιάς.

Βιβλιογραφία

- Adams M.D., Celniker S.E., Holt R.A., Evans C.A., Gocayne J.D., Amanatides P.G., Scherer S.E., Li P.W. et al., (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287: 2185-2195.
- Afshar K, Stuart B, Wasserman SA (2000) Functional analysis of the *Drosophila* diaphanous FH protein in early embryonic development. *Development* 127:1887–1897.
- Alphey L (2002) Re-engineering the sterile insect technique. *Insect Biochem Mol Biol.* 32(10):1243-7
- Alphey L (2007) Engineering insects for the Sterile Insect Technique. In *Area-wide control of insects pests: from research to field implementation* (Vreysen, M, Robinson A and Hendrichs, J, eds.), Springer, Dordrecht, The Netherlands, 51-60.
- André Barretto Bruno Wilke, Marrelli MT (2012) Genetic control of mosquitoes: population suppression strategies, *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 54, 287-292.
- Ant, T., Koukidou, M., Rempoulakis, P., Gong, H. F., Economopoulos, A., Vontas, J., Alphey, L. (2012). Control of the olive fruit fly using genetics-enhanced sterile insect technique. *BMC biology*, 10(1), 51.
- Atkinson PW, Michel K (2002) What's buzzing? Mosquito genomics and transgenic mosquitoes, *Genesis* 32, 42-8.
- Bate C.M. and Martinez-Arias A. (eds), 1993. *The Development of Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Beronja S, Tepass U. (2002) Cellular morphogenesis: slow-as-molasses accelerates polarized membrane growth. *Dev Cell* 2:382–384.
- Billah K.M., Kimani-Njogu W.S., Wharton A.R., Overholt A.W., Wilson D.D. and Cobblah A.M. (2008). Cross mating studies among five fruit fly parasitoid populations: potential biological control implications for tephritid pests. *BioControl* 53(5): 709-724.
- Calvitti M., Antonelli M., Moretti R. and Bautista R.C. 1999. Oviposition response and development of the egg-pupal parasitoid *Fopius arisanus* on *Bactrocera oleae*, a tephritid fruit fly pest of olive in the Mediterranean basin. *Entomol. exp. Appl.* 102: 65-73.
- Campos-Ortega J.A. and Hartenstein V., 1997. *The Embryonic Development of Drosophila melanogaster*. (2nd edition) Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, Germany.
- Chomczynski P (1992) Solubilization of formamide protects RNA from degradation. *Nucleic Acids Res* 20: 3791-3792.
- Church GM & Gilbert W (1984) Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci* 81: 1991-95.
- Crovetti A, Quaglia F, Loi G, Rossi E, Malfatti P, Chesi F, Conti B, Belcari A, Raspi A and Paparatti B (1982) *Frust. Entomol.*, 1st Entomol., 5: 133-166.

Eckermann KN, Dippel S, KaramiNejadRanjbar M, Ahmed HM, Curril IM, Wimmer EA. (2014) Perspective on the combined use of an independent transgenic sexing and a multifactorial reproductive sterility system to avoid resistance development against transgenic Sterile Insect Technique approaches. BMC Genet. 2014;15 Suppl 2:S17

Edgar BA, Schubiger G.(1986) Parameters controlling transcriptional activation during early *Drosophila* development. Cell 1986;44:871–877.

Franz G (2002) Recombination between homologous autosomes in medfly (*Ceratit* capitata) males: type-1 recombination and the implications for the stability of genetic sexing strains, Genetica 116, 73-84.

Fu G, Condon KC, Epton MJ, Gong P, Jin L, Condon GC, Morrison NI, Dafa'alla TH, Alphey L (2007) Female-specific insect lethality engineered using alternative splicing, Nat Biotechnol 25, 353-7

Fullilove and Jacobson (1971) Nuclear elongation and cytokinesis in *Drosophila* Montana, Dev Bio 126, 560-577

Gouw JW, Pinkse MW, Vos HR, Moshkin Y, Verrijzer CP, Heck AJ, Krijgsveld J (2009) In vivo stable isotope labeling of fruit flies reveals post-transcriptional regulation in the maternal-to-zygotic transition, Mol Cell Proteomics 8, 1566-1578.

Hanife G (2014) Embryonic development of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* Rossi (Diptera: Tephritidae), in vivo Turk J Zool 38: 598-602.

Haniotis G.E. and Voyadjoglou A. 1978. Oviposition regulation in *Dacus oleae* by various olive fruit characters. Ent. Exp. Appl. 24: 387-392.

Hunter C, Sung P, Schejter ED, Wieschaus E. (2002) Conserved domains of the nullo protein required for cell-surface localization and formation of adherens junctions. Mol Biol Cell 13:146–157.

Ibnsouda S, Schweisguth F, de Billy G, Vincent A. (1993) Relationship between expression of serendipity-a and cellularisation of the *Drosophila* embryo as revealed by interspecific transformation. Development 119: 471–483.

J.M.W SLACK (2007) Βασικές Αρχές Βιολογίας Ανάπτυξης, Ακαδημαϊκές εκδόσεις 2η έκδ σελ 189-194.

Kapatos E and Fletcher BS (1983) Proceedings of CEC/IOBC International Symposium, November 1982, Athens. p. 593-602.

Kapatos ET & Fletcher BS (1984) The phenology of the olive fruit fly, *Dacus oleae* (Gmel) (Diptera, Tephritidae), in Corfu Greece. J Appl Entomol 97: 360-70.

Karam N., Guglielmino C.R., Bertin S., Gomulski L.M., Bonomi A., Baldacchino F., Simeone V. and Malacrida A.R. (2008). RAPD analysis in the parasitoid wasp *Psytalia concolor* reveals Mediterranean population structure and provides SCAR markers. Biological Control 47: 22–27.

Karr TL, Alberts BM (1986) Organization of the cytoskeleton in early *Drosophila* embryo, J Cell Bio 1102,1494-1509.

Katsoyannos P (1992) Olive pests and their control in the Near East. FAO Plant Production and Protection Paper No 115.

Kellogg DR1, Sullivan W, Theurkauf W, Oegema K, Raff JW, Alberts BM (1991) Studies on the centrosome and cytoplasmic organization in the early *Drosophila* embryo. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1991;56:649-62

Knipling EF (1955) Possibilities of Insect Control or Eradication Through the Use of Sexually Sterile Males, Journal of Economic Entomology 48, 459-462.

Konstantopoulou M.A, Milonas P. and Mazomenos B.E. (2006). Partial purification and insecticidal activity of toxic metabolites secreted by a *Mucor hiemalis* strain (SMU-21) against adults of *Bactrocera oleae* and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). Journal of economic entomology 99(5): 1657-64.

Labbé, G.M., Scaife, S., Morgan, S.A., Curtis, Z.H., Alphey, L., (2012). Female-specific flightless (fsRIDL) phenotype for control of *Aedes albopictus*. PLoS Negl. Trop.Dis. 6, e1724.

Lagos D, Ruizb FM, Sánchez L, Komitopoulou K (2005) Isolation and characterization of the *Bactrocera oleae* genes orthologous to the sex determining Sex-lethal and doublesex genes of *Drosophila melanogaster*. Gene 348: 111-121.

Lecuit, T., Wieschaus, E. (2000). Polarized insertion of new membrane from a cytoplasmic reservoir during cleavage of the *Drosophila* embryo. J. Cell Biol. 150(4): 849--860.

Liang HL, Nien CY, Liu HY, Metzstein MM, Kirov N, Rushlow C (2008) The zinc finger protein Zelda is a key activator of the early zygotic genome in *Drosophila*, Nature 456, 400-403.

Loncar D, Singer SJ (1995) Cell membrane formation during the cellularization of the syncytial blastoderm of *Drosophila*. Proc Natl Acad Sci USA 92:2199--2203.

Marrelli MT, Moreira CK, Kelly D, Alphey L, Jacobs-Lorena M (2006) Mosquito transgenesis: what is the fitness cost?, Trends Parasitol 22, 197-202.

Mazomenos BE, Pantazi-Mazomenou A, Stefanou D (2002) Attract and kill of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* in Greece as a part of an integrated control system. IOBC wprs Bulletin 25:137–146.

Mazumdar A and Mazumdar *M (2002) How one becomes many: blastoderm cellularization in *Drosophila melanogaster* BioEssays 24:1012–1022,

Meats A, Maheswaran P, Frommer M, Sved J (2002) Towards a male-only release system for SIT with the Queensland fruit fly, *Bactrocera tryoni*, using a genetic sexing strain with a temperature-sensitive lethal mutation, Genetica 116, 97-106.

Merrill PT, Sweeton D, Wieschans E (1988) Requirements for autosomal gem activity during precellular stages of *Drosophila melanogaster*, Development 104, 495-510.

Merrill PT, Sweeton D, Wieschans E (1988) Requirements for autosomal gem activity during precellular stages of *Drosophila melanogaster*, Development 104, 495-510.

- Montiel-Bueno A. and Mata M.S. (1983). In: Proceedings of CEC/FAO/IOBC International Joint Meeting, April 1984, Pisa. Cavalloro R. and Crovetti A. edition. 420-427.
- Mullis KB, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G et al (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 51: 263-273.
- Nardi F, Carapelli A, Dallai R, Roderick GK, Frati F (2005) Population structure and colonization history of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Diptera, Tephritidae), Mol. Ecol. 14, 2729–38.
- Navrozidis E.I., Vasara E., Karamanlidou G., Salpiggidis G.K and Koliais S.I. (2000). Biological control of *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) using a Greek *Bacillus thuringiensis* isolate. Journal of Economic Entomology 93(6): 1657-61.
- Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH (1982) Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. EMBO J 1: 841-845.
- O’Kane C.J. and Gehring W.J., 1987. Detection in situ of genomic regulatory elements in *Drosophila*. PNAS USA 84: 9123-9127.
- Ogaugwu Ch, Schetelig Marc F, Wimmer Ernst A (2012) Transgenic sexing system for *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) based on female-specific embryonic lethality, Insect Bioch. And Mol Biology 43, 1-8
- Paolo Gabrieli, Andrea Falaguerra, Paolo Siciliano, Ludvik M Gomulski, Francesca Scolari, Antigone Zacharopoulou, Gerald Franz, Anna R Malacrida, Giuliano Gasperi (2010) Sex and the single embryo: early development in the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*, Developmental Biology 10, 12
- Robinson A (2002) Genetic Sexing Strains in Medfly, *Ceratitis Capitata* , Sterile Insect Technique Programmes Genetica 116:5-13.
- Rothwell WF, Zhang CX, Zelano C, Hsieh T, Sullivan W (1999) The *Drosophila* centrosomal protein Nuf is required for recruiting Dah, a membrane associated protein, to furrows in the early embryo. J Cell Sci 112:2885–2893.
- Rousse P., Chiroleu F., Domerg C. and Quilici S. (2007). Naive *Fopius arisanus* females respond mainly to achromatic cues. Biological Control 43: 41–48.
- Schetelig MF, Caceres C, Zacharopoulou A, Franz G, Wimmer EA (2009) Conditional embryonic lethality to improve the sterile insect technique in *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae), BMC Biol. 7,4
- Schetelig, M.F., Horn, C., Handler, A.M., and E.A. Wimmer. 2007. Development of an embryonic lethality system for SIT in *Ceratitis capitata*. In Area-wide Control of Insect Pests: From Research to Field Implementation. M.J.B. Vreysen, A.S. Robinson and J. Hendrichs (eds.). Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 85-93.
- Schiipbach T, Wieschaus E (1989) Female-sterile mutations on the second chromosome of *Drosophila melanogaster*. I. Maternal effect mutations, Genetics 121, 101 - 117.

Schmid, K.J., Tautz, D (1997) A screen for fast evolving genes from *Drosophila*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94, 9746-9750.

Schweisguth F (1989) The serendipity alpha gene encodes a membrane-associated protein required for the cellularization of the *Drosophila* embryo, Genes Dev 4, 922-931.

Schweisguth F, Vincent A, Lepesant JA (1991) Genetic analysis of the cellularization of the *Drosophila* embryo, Biol Cell 72, 15-23

Schweisguth, F., Lepesant, J.A. and Vincent, A. (1990) The serendipity alpha gene encodes a membrane-associated protein required for the cellularization of the *Drosophila* embryo. Genes Dev. 4, 922-931.

Sime K.R., Daane, M.K., Messing H.R., and Johnson W.M. (2006). Comparison of two laboratory cultures of *Psytalia concolor* (Hymenoptera: Braconidae), as a parasitoid of the olive fruit fly. Biological Control 39: 248-255.

Spradling A.C. and Rubin G.M., 1982. Transposition of cloned P-elements into *Drosophila* germline chromosomes. Science 218: 341-347.

Tadros W and Howard D. Lipshitz (2009) The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts, Development 136, 3033-3042.

Tautz D. and Pfeifle C., 1989. A non-radioactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene hunchback. Chromosoma 98: 81-85.

Theurkauf WE. (1994) Actin cytoskeleton. Through the bottleneck. Curr Biol 4:76-78.

Thomas, DD, Donnelly CA, Wood RJ, Alphey LS (2000) Insect population control using a dominant, repressible, lethal genetic system, Science (New York, N.Y.), 287, 2474-2476.

Tsitsipis JA (1980) Effects of constant temperatures on larval and pupal development of olive fruit flies reared on artificial diet. Environmental Entomology, 9: 764-768.

Van Houdt J.K.J., Breman F.C., Virgillio M., De Meyer M.(2010) Recovering full DNA barcodes from Natural History collections of Tephritid fruitflies (Tephritidae, Diptera) using mini barcodes. Mol. Ecol. Resour, 10:459-465.

Yokoyama V.Y., Rendón A.P. and Sivinski J. (2008). *Psytalia* cf. *concolor* (Hymenoptera: Braconidae) for Biological Control of Olive Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) in California Environmental Entomology. Environmental Entomology 37(3): 764-773.

Zhang CX, Rothwell WF, Sullivan W, Hsieh TS (2000) Discontinuous actin hexagon, a protein essential for cortical furrow formation in *Drosophila*, is membrane associated and perphosphorylated. Mol Biol Cell 11:1011-1022.

Αυγουστίνος Α (2005) Απομόνωση μικροδορυφόρων από το δάκο της ελιάς *Bactrocera oleae* και χρησιμοποίησή τους για την ανάλυση φυσικών πληθυσμών του είδους. Διδακτορική διατριβή, Πάτρα 2005

Ζιώγας NB (1996) Ο δάκος της ελιάς Σελ 25-26, 44-45, 48-52, 89-97

Μαυρίδου Α (2014) Ταυτοποίηση και ανάλυση γονιδίων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του δάκου της ελιάς. Διπλωματική εργασία, Λάρισα 2014

Πελεκάσης Κ (1980) Μαθήματα Γεωγραφικής Εντομολογίας Β' τόμος, Ειδική Εντομολογία

Τζανακάκης Μ, (1980) Μαθήματα εφαρμοσμένης εντομολογίας Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη. σελ 364

Τζανακάκης Μ, Κατσόγιαννος Β, (1998) Έντομα καρποφόρων δέντρων και αμπέλου. Εκδόσεις Αγρότυπος, Αθήνα

Παράρτημα Ι

Χαρακτηριστικά των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για ενίσχυση τμημάτων του γονιδίου *sry-a* του δάκου της ελιάς. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι αλληλουχίες των ομόλογων και ετερόλογων εκκινητών, οι θερμοκρασίες Tan και το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος κατά την ενίσχυση του γονιδιωματικού DNA με PCR.

Όνομα Εκκινητή	Αλληλουχία	Tan	Αναμενόμενο μέγεθος προϊόντος
<i>sry-a</i> F1	5'-AAT CAG CGC ATT ATG TC-3'	48°C	111 bp
<i>sry-a</i> R1	5'-GCT TTT ATT CTG CGA TG-3'	55°C	111 bp
<i>sry-a</i> F2	5'-ACC GAT GTA TTT ACG CCA CG-3'	58,4°C	188 bp
<i>sry-a</i> R2	5'-ACG CAA ACT TTC TTT CCG ACG-3'	59,4°C	188 bp
<i>sry-a</i> F3	5'-AGT GTC GCA GTA GTA GCA C-3'	57,3°C	213 bp
<i>sry-a</i> R3	5'-ATT ATC GAG GTG TTC AGT AAA-3'	53,5°C	213 bp
<i>sry-a</i> qRT F1	5'-GTG CGG TAA GCG ATT CCA-3'	56,1°C	117 bp
<i>sry-a</i> qRT R1	5'-CGA CAC TGC CTG AAC TGA-3'	56,1°C	117 bp
<i>sry-a</i> qRT F2	5'-GAT AGT ATA GAA CCG AGC ATT TG-3'	59,3°C	98 bp
<i>sry-a</i> qRT R2	5'-GTT ACC ACG CAT GGA ATC G-3'	57,3°C	98 bp

Παράρτημα II

Παρακάτω δίνονται οι αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν για την *in silico* ανάλυση του γονιδίου *sry-a* του δάκου της ελιάς.

sry-a B.o genomic sequence

- AGTTGACGATCCAACAACAATGATAACAATTGCATGATACAAAATTCTCTCATTACGCTCTCACACTATTCCCGTATCTCGTAGGATACAATCATGG TTGCCGTTGAACCTTTTTCTGGCTCATAAAGTGGACCAAAATTGAGTAAAAATGGTCCAAAACTAAGCATATTAAGATGATATAGAATGAATATA ATGTACCTATATATAGCAAAATCAAGTATAGGACCAAGTATTCTATATTAAGAAATCTGAAAAGTATTTAAAGAATGTTTTGTTGAGCAAAATAAGG AGGGTGTCCAAAATCTAACAAATTTAAGAAGAGAAATCTTCAAATATTACCGATTATCAAGATATAAATAGTTTTGTCATGCAATTTTGATTTTGGT TAAATATCTTACATTAATAAATTTGATTATAAATTTTTATAAAAAATCTTAATTTTAAAGATAAATTTTACCACCTGGCAACACTGAACTTGACC CAAATTCAGAGCTGTTTCGTGTTGCCAGATTGATAAATAGAGAACAGTCGAGAACTATTTAGCACACATGTTGAGATCAGGGATAATTTAACAT TTTTACCAGAATCCCATAAATAATGTTTTATCATTAAAAAGCATGTTAAAAGTGAAGCTTTCTCCAAAATAAAAAATTTTATAAGAGATATACAT GGGCTGCCAAGTCTGAACAATTTCTAATGAACCTCTCTATATTTCTTAGGGAAAGTAAAAAGACATTTAATCCCAATAAACTTTCAAATAACATTG AAAAAAGTAAATGATAAATAAAGAGTATATACATACATAAATATATATTTATAAATTTTACCAGCTCCGATCATATGGTCGTAACCTCTCATT CACAATAGCTTAACCTTAGCCATGTCATTATACCGCATTTTTGGACTTGGAGCTGGTAGAATCACAACCACGCTTTTGCATCTTAAAACTCAGCTATTA AAAATGCCGCAATGGAGGAGATTATTGCCAACACAACGCAATGCGCAAAATCATTTCGTCCATCTCAGCAGAGGTACGAATCCGTGAAGAAATATG GTATATAACTTAGGTTTTATATGCTTATATATGTTTATGTTGGGCGTCATGCGAGGAGAGCTTCTGCGCATAAAAACAACAATTGAGCAAGAAAAA CGCTTTGTTAAAGCAACAAGTTGAGATTGCGCAGCAGCAACTCATAGCACTAGAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGT AAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGT AAGGAAAAAGAAACCGAAAAAGGAAAAAGACTAATGCAAAACACAAATACAAATGCCCGCGGAACCTTCAGTAGATGTCGGTCGCTCGATATGCGTGT AGGCCAAAATAATTGAAGTTGGTCGTATCCCGATGCGAGACGTTTATATTGGAAGATCGACTGTGGAGAATCCCAACCACGAACCGTAGTATCTG GTTTGGTTAAATTTGTACCTTAGAAGAGATGCAAAACCGTCTAGTGGTTGTGCTATGTAATTGAAACGAGCCAAAATGCGTGGTGTAACTTCCGAA GCGATGGTCATGTGTGCTTCAACACCAGATAAAGTGAAGTCTCAGCCCCCTTCAGGTGACGTAACCTGGTGACTTGGTGCTTGTGAGGGTTACAC TCGCCAACACAGATGCTCAACTTAATCCTAAGAAAAAATATTTGAAACTTGTGCACCTGATTTAAGAACGAATGACGACTTGGTGGCTGTTATAAAG GTTCGTGCTCCATGTGCTGCGCAAGGAAATGTTGTTGCACAAACGCTGAAGAACGTGAATGTGAAGTAAACCATGATACAAACGTTAAAAAATTAA AGTTTTCTTTAACGACAACATGCTAAGCAGGTTGTTAATACGTTTTATGCGTTGAAATATTTATTTTATAAATTTGTTAATAAATTTAGATATGGA AATTATAAAAAAGTTTAAAGAACATAAATAAAAAATAACAAAAACGAAAGTAACCAACATTTTCCCATATTTAGATTTTATATAGTATCTTATT GTGGTGGTGGATGTCGAAGCGTAGGGTTGGATTGCGCTCAACAACAATCGTTTTAGTTGCTATATCATAAGCTGTACGATTATTTTAAAGAAAAATC ATTATAAACACATTTGAAAAAATAGGGTCATTATTAATCTTTGATACGCGACGATGAAAGCTCGTTGGAATGTTGGCACCTCATTTGGAATAT AAGTGCACGTATGGTATACGTTGGCTTGAAACCTGAAGCTGTCTTGCAAAATGGTGGTGGCTGTGGTTGCATATCAGCTGGTAGTGGTAAAGGAT AAATGGCTCTACATATGTATGCGTATTTTCATGGCCGCTTGCTGGCGTAGCACCGTTATACGCTGTGTCCATATGGCCTCGTAGAAAAAACT ATATTTTGGTTAATAGCTCAAGCATTAGAAGATCTGAAGAAAAAGCTAGAAAGTCCATAGAACAGCCAAAAAATTAACGTAATCATCATCTTCAAT GGCTTTTTCGAATACTTCTTGTGAGATCAAAACCCAAATCCTAAATCAAATAAATTCATAATTGTAAGGTGACTACAATCTTCAGCAACAGTAATA TAACCATATCGATGATTTTCAGCAACCACACGCTTCCAGAAAGGTTGCAATACATACCTCGTAACACCTGTACGATGAATTAAGTTCACTTTGTAGTTGA TCCTTAATATGCGATACTGAAATAAACGCGTCCAGCTTACCAATAGCGTTGGCATCGGCCGCTTTAAATTCGGAGTATTAGCTGGCACCGCTTG TGTATTAATGGGTGGTATTGTACGCCCCAACCCAGACAAAGGATTATTGATCAGGTTTTGAAACACTTGTGGATAGCTATGATTAAATACAAAGGGA AAAGAGCCATGGCATTTTGGCAGATATTAGCATGTTTCACTGAAACAAAATTTGATCAAAACAATACACAACCATGTCATACTTTAAAGCGCAATA CAAACCCATTCGTTTAGACTAGCAAAATATGCTTCTTGGTAGTAATTTTATGTCCTAATATCACTTTCTGCTGTTGGTGCAGATGTGACTAGTTTCTC CTTTTCAGCATCTAACTGTTGGGCTTCTGCGCAACTGGAGGTGTGGTGTGCTGCTCGCACTTCTTTTCAATTTTTATGTCGTTTTCTTATCTACGG ATGCCATTTCAATTATTGTTTAAATTTGAAAACAAATTCATTAATAAGGTTTTCTATTTGTTATATTTGTTATGTATATTTGTTGCTGTTTTTTTT CTTCACCAATTTGGACACGACATTCGTTTTAATTATTTAACCAGACATTGCGCAGTACTACCTTTGTATACATATATATTTTGTATCAGCTGTTTGTA CCGACCTATTCACAATGATGTGAAATTCACATTTATTTACATTGAAGGAAAGAAAAACAAACAAATTTGTAATAAATATTAAGTTTCATACTGTTAGG AGTAGATATCGTAAGCTTTTTTTTAAATAAATCTCTGTCTTCCAAATATGGCATATAAAATTTAGCTATTGTCTGTTTTTTCGCATCAAATCCCAAT AAAAAAGTAAACAAATTTGGCAATTTGCAAGGCAATTTTTTGTTCGAATGATACTTTCTATACTCAGCGTAGCGTTGAAATTTTTCGATTGTAAGGTTTTGA AATAAACTGTTAAGAAGAACGGATCCAGATTGTGTTCTGAAAAGGCTTCTTCACTTTCAAGTGTTCAGACACGGCTTAACTTTCGCGGCTTCTCC AGTTTTCTTATTGACGTCAAGATAGATAACAACAGCATACTCATTTAAACCAAGCTTAATTATTACTTTAAATATTTCAATATTACGAACGTGAAA GACTGGTTTTTTTTGTTTTTATTGATATTCATAGTTTCAATTAACATCGTAATAAATTTACAATTTAGGTTGGTGTATTTAAAGAAATGTGGAATTTGA ATTTGATTTAAAGTATCATATAAGTTGCGGTCTACAATCAAATTCGATTTAGCTTTGGAAGGAAACATCTTCACATCATACATACATACTGATCT TAGCTTTAATATATATACATATTCAAGCATATTTTTCACATCATCTCAGTTTTCAATATTTTCGATTTAAGTAAATACAGCTGATCGAGGATTGTTAAGC CATAGAAGTACAGCCGAATGTTAATAAATAATAGTAAATCATTATACGGTATGTAAAAATAAAGTATTTATATATTGCATTTAAAAAGTTTAAATAAT GGTTCCTCCACACTCTTGACGCGTACTTTAGCGGTATATTAATTTGTAATATTTACGACAGACGGCTGACGTTTTATTTATACATTCATGGTTC AAAGATTTATACGTGTGGTACGTTAAGTACTGCATCCATTAGACATTGACGTTTGATACATGCTTAGGAACCAAAATAAATAATTTTCGAGTACTA TGATGAACCTGGACATAAATTTGAAAAAATAAATAATTTGTTGAAAAATTAATAATATACGTTGGTTTTCTATTCTAGACAAAAAATTTTTTAATTCGG TCGTATTTTCTGTTTACATGCAAGTTAGGAAATTTAATGCGTTATTTTAAAAAACGACTTTGGAATTAATAAGCATGTTAAATTTGGCAAAATTTTA GAAACACATTTTCCATATCTATACTGATTGTTTATCGAATCATTAAAGGAATATTAATATATATTTTAAGTATTTGAAATAAATTTACTAAGCAT ATTTCCCTCTTTTGTATGTACACTTAAGACGACAACACACCGTTGACGGCGTTACGATTGCGAAATATTGAACAAGGCAAGTTGAGTTTTGACGACA

TACCACGCAGGCGTTATAGATTACCAACCCGCAAAATCACCGTCCGCTCACTGCCACACATTACCGATATTTAAGTTGCTGAATTGCTGGTTAGACCG
TGTGTATTGGTGGACGTAGCACCGGCCAGCAGTTGGTGC GGCTTGAACGCACCTTGACATCTGCATATTTCCCAATGGCATACTCATACTCATTGG
TGGCTGTTGCATCATTTCCCGTCGTAGTTGCGCCCATGCCATCATAGACATTCGGCTCAGTAGATTTTGATTGCGTGCATTAGATTTAAATTGCTAA
CTGGTTGTCATTGTTAGTCATCATATTTCTAGGCTGGACATATGTTGCTGTGTACACGCCAGTACTAGTCGTTCCCGGAAACTGTGCACCAAAA
CCACCAAGTTGCACAGCGCCACCCAAATGCATTCGGGTGTGGTGAATGCCGTAGGAGCCGTATAACGGGAGCATTATACATGCTGGTGGAAATTTGG
CGGTGTATGAATTGATTTGCTGAGGATGTGGTGCACCTCCACCCTCATATAACCAGGAGCCATGCCACCCGAATAGGCCCAAGTTGCAGCAAAACA
TCGGTTGCGGTTGGTTAAAGGCAATTGGCCGCTGTGCGGATTGTGGGAGGCTACATTGCTGGTTGTTGCTGTACCGTACAATGCTAATATACATCT
TTAGTAAGCTTCCCTGATTATCTTTTTCGCCACCACTCAGAGATCCCTGATTGAAGAAGTCTTCTCATCTTTTGCAAGCGAAATTTGTGTGGCATT
TTGTCCATTCAATTCGGCTGCTTTATTTTGATCTGTTGTGACGCTGCGGATGGTACTGCACTAAGAAAACCGGTGAAGCTGTCTTTTGCAAACTCT
GTCTGTACTATTACCCATACTATTCTGGACGGGTTTTGTGGGTGAGGACAAACCCAGCAAAATCGCTGCTCTGATTGCCCTCGCCAACTGTGAATTT
GCTGTAATACGCTGAGTTTTAGGGCTACAGCCACTTCCAGCTTGTCCGGCTTCGGTTTTGGCAACGGTGTGGTAGTGGTGTGATTAGATACTGA
TGCTAAAGATGTACTACTTTTCTTATCACCTCCGCCACCAATAGCACTCATCAGCTCAATCCATTGAAGTGCAAGCTTGAGCTGCTTTTTTCTTAC
GTTTCTGTGCTCTAATTTCTTATCGATTTCCTTCGCCAGTCTACTTTAGGCGCGATGGTGGCACCATTACAGTGCCTAAATATTTTTATGTTCA
TACTTAGCGGTATGAAGACTCCAACGCTGTATCGCTGAGGCGCTGCAAAACCATCTGGCAGCTGTGCTTCATACAGGCACGCGCAGCGAGTT
GCCCATCTGTTGCAATGAAATCACTTGTCTGGTGTCCAAGTGTCTAGGTTAACCGATTAAACACGTGATATGTTGACGCCAAGATTACGATGTATAC
CTGCGCAGCGTATGCACAAGAATACCCCAAGATTCCATGATGCCAGCGTGGACCTAAAAATGTCGAAATATTTTTGAGTAAATAATTGTAGCAAT
AATGCAAAATGATGGCTTTATATGTATATCACAACAGTAACAGTAGAAATGCTTATCAGTTTAACTGCTTGGCAACAACAAAATGTCTGCGTG
GTTAGTGCATCGATTTTTAATGAAAGTTGTAAGAGATGCTTTATCGAAATGCTACTCTATTCTCTCGCGCTCATATCCCATGTGATCTTTACATTT
GTTGAACAAAATAGATATTTAACTGTGACTCATAACCAAATATATATGAATAGTAAAGTAATTTTAAATTAATGTTGTTGCAAGTAAGGCAAAAAG
GATCTGTACTTCAAGCAAAATCTTCAAAAGTTAAATACCTTAAGAGATAACTTATCAGTGCAAAAAACTAGTGAAACATATTACGTTAAAAATAAAAA
AAACAAAATACCTTTCTGGTTTATATTGATTTTTAGCAATTTTCACTGATAATGGAAAATGATTTTTAAAAATTATGATGGCAGAAAATGATTTTTA
GGGTGTATTAATAATCAATTTTGCTCTTTTCCAAAGTATGATAAGGAATTTATAGACGAGAAAAATTAACACATCAAAATTTACTGTTACACTCATAGAC
ACGTAACCTGTCACTTTAATCCGACAACGATATTCATATCATTGACAGCGGTATTAGGAAACGTAAGTGGTTCGCACATTGCAACTATGGAATGTAA
TTTTTTGTACTTTCAAGCGTTGGATTGTTCAATCTTAATTTGAAATAGCTCAAAATTTGGTCTGCTCACGATTTTTATGAATAATTTTATAATCATTAATA
ATGGTCTCTCATTGCTGCTGCAAAATAAGTTTGATTTAAATATAAAACATTGTCAATATTACTGACACTAATGTTATCGACTGCACCCACCTTACAC
TGGGAGCAAAATTAAGGATTGGCATATTTAATGATTACTGTAGATTTAATGATTTGTGTGTTGGTATCCAGTATGAAATGACAATTTTTCCCCC
CGAGTGCCGCATCTATATTTTTTATTAATATCTTTACCTTTTGCATCGCAATCGACGCAATATTTATTGTCTCATCGCGAAGCATCTGAGTCAAC
AGAGTTTGGCATTTTTTCTGTATTAATTTGGTCTTTTCAATTTTCTTTCGGCTAGCAGTTGAAGTCAATTTTTCCACTTCACTATGTTGAACACACT
TGTAAGAGGCTTTGTTTCTTAAACGATCAATATGACCACCTGTACTACACTTTTCACTTTAATTTGCACTATTATGATTGCTGCATTGTTTATATAT
TAGCAAAATCAATTAATAAACAATTTTGAGTAGATTTGCAAAATGCTGCTATTGAAATAACTCTGTGCAATCAAAAAATAAAAAATATTCTTTA
TGACATTACTGAAAGAAAAACGTCGAATGACGGCGAAAAAGAGCGAAAGTTGATTGTCAATGCCAAAAGACAAAATCAGAAACGTCATAGGGCGAA
AACATTCTATGTATTATCACAATGCATCAACAATTAGCTAATCATAGAAAAATAAGATAAGAAAGGCCAATGTAATTTTTCGAACATTTTTAATTC
AACTATTGGAATATTGCTGCATCTGCATATAAAGAAATGAAGATTTTCAAAATCTCGTTATGTATATGGCAATGGGAATTTGTGAACAGTAG
AAAACTTTATGCAATTGTGACTGGTTTATTATGGGAAGAGATAAGAAACAATTC AATTTGAAATAGTCAACGGAACATTGAAAAAATTTAATTGTA
TCAGCAAAATATTTACAATTAATAATTTAATTATGACATCGGTAAAACATAAGTGTGAGAACTCAATTAACGAAATGTGAGAAAAAATATATTT
AGGTTCCAGCGATATGAAACCCGCATAGAGTGGTAAATGTAAGATACTAATGCAAAATGTTTGATTAGGTATAATAGTAATTTACATTTGCAGAATTT
CTGTGGTGATTTTTATTTATTTGCCAACCACTGCACAAATTTATCGCCAGTGAAATGAAGGAAGAGATCATGAGGGAATGAAATGATGGATAACA
TTTTCTTTGCTTGGCTCAAGTATGCTTGTGTACAAAATATCTGGAACGAATATACGAGCGGAGGATACTGCTCGTAATGCAATACAGTATGTGTA
AAGTATGCAGAAAAACGTTAATTTCAATTATCTAATCCCAACAGAGTTCTCGGAACATTTTATTGATCGCATTAATGTTGTGCTTCGACAAATTAG
AAAAAGTTTATAGTAATTTATGCAATCCTGAGAATAAATCAGCTAAACAGTTAATGTCTGGTTATGGATTTATTACCTTGTGATATTGCAATGGAT
CACTTGAAAGAGTACAATCTTACCAGGAAGATGAGAATATTGATACCGATGAACATAACCACTTGAAGATGAAGTTTTATTTACTATCAATAAT
GAGAAGATTTTGATTTTGTACAATAAATGGTAAGTATATTTGAAATCAAAATAAATCGATTAATTTTTCATATAAATTTACATAAAATTAGGCACT
AGACTCCAGTAAAGAAATTTACCAGCGCTGCTTTAATGATCAGTATGCATCTGCGCTAGCAAAATGTCGATGATTGAGGATAAAAACAGCAATCA
GCGCATTTATGTCAAAAGGTAAAACATTGTTATATGATAATGAAAGAACAAATTAACCTACTGATTATGCTTTAGGCTTTGCGAGAATGCACTGGATTT
CAACAGGAATGTCAAAGCAATTTGAAACTCATACGAACATAAATTTGGCATCGCAGAATAAAGCAATCGCACTGGGAGCCTCATTAAACGCAATTGCA
TCAGTACATTGATGGCACCCTTTGCGTTAATATTCTTTGTTTCGCAGATTTAGAAAAGTTTTTATTGGATAAATGCGCGCTAAGATGCGCCAAA
ACAGAGCAGCAGCTCCGAGTTAGATGAATTCATAGCAGATTTTGATGTAATCTAGATAGATTATCACAATTTGACTCTTTGTGCTAGCGACGCC
TTGAAGCCCAATGTAACCTTTTTCTTTTTATTTTATAGTCAGGTAATTTATATACAATACTCATTTTAAATTTACAGTAAAGACTTTGGTGCAGATT
GTATGGCATCGCTGGAAGCACTAGATTATGATATTATACCTCATTGCAAGCATATAACGGCACCGATATGCATACTGAAATCTGGAGCAGCATTTT
TATGAAGAAATTAATAAGTTCAAAACAGTTTTATGAAATTTGCGATGCACAGCCGATCACTAGATGTTTTTACGAATTTGTTTCACTCATGCTTGC
TGACACGGAAGCAATTTAACAAATCGAATTTGGAAGATTTGGCACAATGGGCGAATTTCTTGTCAATATTTTCAATATCTGCCAACAAAAAG
AACTGCTACACTCTCAAACTTAAAAATAATGCAC TAGAATTTTTCAAAAATACAAAATTTGATGTTAAATGAATGTGCGGCCATTTTAGTATGTGCC
GATCAGGTGGATGACGTGCGTATAATGAAACGTTTTAAATTAAGTGTGCTATTTTGGCGCGTTTCGTTGATGCGCTTGAGCCAACCGAAAATGTGTC
AGACAAAAAGTTGAAGAGAATCTTACTGTTATACAAGCACTGCTACTGATATACAAAACAATTAAGTGAATGCATCGCAGTATATACTAGATA
GTATAGAACCAGCATTGTCAGCATATTGTATCGCAATGAAACCGATGTATTTACGCCACGTAGGCGTGCGGTAAGCGATTCCATGCGTGGTAACAT
TCTAAATGTTCAATATTCAAAACGATAAAGTCTATCAATACAAAATTAACGATGGCGCGCAAAATCAGTTTCAAGCAGTGTGCGAGTAGACAC
TGGCAGCAGTATGCGTGGAGTGGTACTTTTATCATAAATGTTTTTTTCCACCTAAATAATTATTTATCTGTTTACTGTTTGACAGAAGAAAGTT
TGCGTACAGTGATGTTTAAAGCGTCAAAATCTGCAGAGACACAGAAAATTTGTAATTTTTTATTGCAAAATTCGGCCAGTTTGCAAAATTTGCGGTAA
AAAAGTACGCAATTAACACAAATATTGCAATTTCAATTTTTTGTCTATAGAATACTAGATCAATTGACGGAGATATCTGGTAACAGCCCGAACGCA
ACACAAGAACATTTACTGAACACCTCGATAATGGAATAGATAATCTACTTGCACTTTAAATATTAAAAAAAATCTCAATTGTGAAGTGTTCG
GCCTATGCAATCTTAAAAATATCTATCTATAGCTTATTTATATTGAAGTATAACTTTGATATGCTAATTTTCGTTGTAATTTTTAAATATTGATG

TGATTATTTGAACACCTTATTATTTTATTATTTAAATACCAATAATTGTTTCAGAGTCGTCGTCGTTAATATTTTCAACAACAATAAGTATTGTATTGT
GATCTTTTATAACTGCTCTTTCTTAAGATTTATACAACCTCTCTTATACTAATAAGCTCTACAAATTGTGTACGCGTA

sry-a B.o mRNA sequence (RNA-seq)

➤ AAATTTTCGAACATTTTAAATCAAACATTGGAAATATTGCTGCATCTGCATATAAAAGAAATGAAGATTTTCAAATACTCGTTTATGTATATGGCAATGGGAATTTGT
GAACAGTAGAAAACCTTTATGCAATTGTGACTGGTTTATTATGGGAAGAAGATAAGAAAACAAATTCATTTTGAATAGTCAACGGAACATTGAAAAATTTAATTGTATCAGC
AAAAATTTTACAATAAAAATTTAATTATGACATCGGTAAACACCAAGTCTGAGAACTCAATTAACGAAATGTCGAGAAAAATATATTTAGGTTCCAGCGATATGAAA
ACCCGCATAGAGTGGTTAAATAAATTTCTGTGGTGATTTTATTATTTGCCAAACCACTGCACAAATTTATCGCCAGTGAATGAAGGAAGAAGATCATGAGGGAAATGAAA
TGATGGATAACATTTTCTTGCTTGGCTCAAGTATGCTTGTGTACAAAATATCTGGAACGAATTATACGAGCGGAGGATATGCTCGTAATGCAATACCAAGTTCTCGGAA
ACATTTTATTGATCGCATAATGTTGTGCTTCGACAAATTAGAAAAAGTTTATAGTAATTTATGCAATCCTGAGAATAAATCAGCTAAACAGTTAATGTCTGGTTATGGATTT
ATTACCTTGTGTAGATATTGCAATGGATCACTTGAAGAGTACAATACTTACCAGGAAGATGAGAATATTGATACCGATGAACAAACCACTTGAAGATGCACTAGACTCCA
GTAAAGAAGTTTACCAGGCCGTGCGTTTAAATGATCAGTCATGCACTTGCCTAGCAAAATGTCGCAATTGATTGAGGATAAAACAGCAATCAGCGCATTTATGTCAAAGGTCCTT
GCGAGAATGCACTGGATTTCAACAGGAATGTCAAAGCAATTTGAAACTCATACGAATAATAATTGGCATCGCAGAATAAAAGCAATCGCACTGGGAGCCTCATTAAACGCA
TTGCATCAGTACATTGATGGCACCCTTTTGCCTTAAATTCCTTTGTTTGCAGATTTAGAAAAAGTTTTCATTGGATAAACTGCGCGCTAAGATGCGCCAAAACAGAGCAG
ACGACTCCGAGTTAGATGAATTCATAGCAGATTTTGTATGTAATCTAGATAGATTATCACAAATTGGACTCTTGTCTGCTAGCGACGCTTGAAGCCCAAAATTAAGACTTT
GGTGCGCAGTTGTATGGCATCGCTGGAAGCACTAGATTCATGTATTATACCTTCATTGCAAGCATATAACGGCACCAGATATGCATACTGAAATCTGGAGCAGCATTTTAT
GAAGAAATTAATAAGTTCAAAACAGTTTATATGAAATTGTCGATGCACAGCCGATCACTAGATGTTTTACGAATTTGTTTCACTCATGCTTGTGACACGGAAGCAAT
TTAACAATCGAATTTGGAAGATTGGCACAATGGGCAATTTCTCTTGAATATTTTCAATATCTGCCAACAAAAAGAACTGTACACTCTCCAAAACCTAAAAATAA
TGCACTAGAACTTTTCAAAAATACAAATTGATGTTAAATGAATGTCGGGCCATTTAGTATGTGCCGATCAGGTGGATGACGTGCGTATAATGAAACGTTTAAAAATCTG
CGTGCTATTTTGCCTCGTTTTCGTTGATGCGCTTGAGCCAAACGAAATGTGTGAGCAAAAAAGTTGAAGAGAACTTACTGTTATACAAAGCACTGCTACTGATATACAA
CAACAATTGACTTGAATGCATCGCAGTATATACTAGATAGTATAGAACCAGCATTTGCAGCATATTGTATCGCAATGAAACCGATGATTTACGCCACGTAGGCGTGGGT
AAGCGATTCCATGCGTGGTAACTATTCTAAATGTTCAATATTTCAAACGATAAAGTGTATCAAATACAAAATTAACGATGGCGCGCAAAATCAGTTACGGCAGTGTGCG
AGTAGTAGCACTGGCAGCAGTATGCGTCGGAAGAAAGTTTGCCTACAGTGATGTTTAAAGCGTCAAAAATCTGCAGAGACACAGAAAATTTGTAATTTTATTGCAAAAT
CGGCCAGTTTGAATAATTCGGAATACTAGATCAATTGACGGAGATATCTGGTAACAGCCGAAACGCAACACAAGAACATTACTGAACACCTCGATAATGGAATAGATAAT
TCTACTTGAACCTTTAAA

αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί το γονίδιο sry-a στο είδος *B. oleae*

➤ Met T S V K L Q V L R T Q L T K C R E K I Y L G S S D Met K T R I E W L N N F C G D F Y L F A N H
L H K F I A S E Met K E E D H E G N E Met Met D N I F L C L A Q V C L C T K Y L E R I I R A E D T
A R N A I P S S R K H F I D R I Met L C F D K L E K S F S N L C N P E N K S A K Q L Met S G Y G F
I T L L D I A Met D H L K E Y N T Y Q E D E N I D T D E L N Q L E D A L D S S K E V Y Q A V R L
Met I S H A L A L A N V A L I E D K T A I S A L C Q K V L R E C T G F Q Q E C Q S N L K L I R T N
N W H R R I K A I A L G A S L T Q L H Q Y I D G T V L R L I F L C F A D L E K F S L D K L R A K
Met R Q N R A D D S E L D E F I A D F D V N L D R L S Q I G L F A A S D A L K P K L K T L V R S C
Met A S L E A L D S C I I P S L Q A Y N G T D Met H T E I L E Q H F Y E E I N K F K T V L Y E I V
D A Q P I T R C F Y E L F H S C L A D T E K Q F N K S N L E D L A Q Met G E F L L Q Y F Q Y P A N
K K E L L H S P K L K N N A L E L F Q K Y K L Met L N E C R A I L V C A D Q V D D V R I Met K R F
K I L R A I L R R F V D A L E P T E N V S D K K V E E N L T V I Q S T A T D I Q T T I D L N A S Q
Y I L D S I E P S I C S I L Y R N E T D V F T P R R R A V S D S Met R G N Y S K C S I F Q N D K V
L S N T K L N D G A Q N Q F R Q C R S S S T G S S Met R R K E S L R T V Met F K R Q K S A E T Q K
I C N F Y L Q N S A S L Q I S E I L D Q L T E I S G N S P N A T Q E H L L N T S I Met E